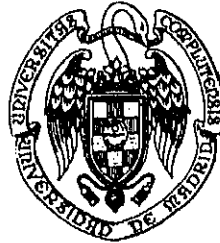


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

**Dpto. de BIOQUIMICA
Y
BIOLOGIA MOLECULAR**



**APLICACION DE NUEVAS ESTRATEGIAS
BIOQUIMICAS Y GENETICAS AL ESTUDIO DE LA
PENICILINA G ACILASA DE *Kluyvera citrophila***

TESIS DOCTORAL

ANA M. ROA ARRANZ

Madrid, julio 1995

Two handwritten signatures in black ink. The top signature is a stylized, cursive 'A' followed by 'M. Roa Arranz'. The bottom signature is a more complex, cursive signature, likely of a professor or official, with a long horizontal line extending from the bottom.

INDICE

INTRODUCCION

1. CONSIDERACIONES GENERALES

- 1.1. Antecedentes históricos
- 1.2. Actividad enzimática de β -lactam acilasas
 - 1.2.1. Sustratos: Penicilinas y Cefalosporinas
 - 1.2.2. Métodos de ensayo

2. FUENTES DE β -LACTAM ACILASAS

- 2.1. Métodos de selección
 - 2.1.1. Microbiológicos
 - 2.1.2. Químicos
- 2.2. Microorganismos productores

3. CLASIFICACION Y LOCALIZACION SUBCELULAR

- 3.1. Clasificación enzimática
- 3.2. Localización subcelular

4. METODOS DE PURIFICACION

5. ESTRUCTURA

- 5.1. Subunidades estructurales
- 5.2. Secuencia
- 5.3. Propiedades en solución
 - 5.3.1. Conformación
 - 5.3.2. Estabilidad y desnaturalización
 - 5.3.3. Renaturalización
- 5.4. Cristalización

6. REGULACION Y EXPRESION GENICA

- 6.1. Regulación transcripcional
 - 6.1.1. Promotor
 - 6.1.2. Inducción
 - 6.1.3. Represión catabólica y efecto del cAMP
- 6.2. Regulación por temperatura
- 6.3. Procesamiento postraduccional
 - 6.3.1. Péptido señal
 - 6.3.2. Procesamiento de las subunidades
 - 6.3.3. Modelo de procesamiento *in vivo*

7. ASPECTOS CINETICOS

- 7.1. Especificidad de sustrato
- 7.2. Centro activo

7.3. Mecanismo cinético

7.3.1. Dependencia de los parámetros cinéticos con el pH

7.3.2. Perfil termodinámico de la catálisis

7.3.3. Cinéticas en estado estacionario

7.3.4. Cinéticas en el estado pre-estacionario

8. APLICACIONES INDUSTRIALES

8.1. Inmovilización enzimática

8.2. Producción de 6-APA

8.3. Producción de 7-ADCA

8.4. Producción de 7-ACA

8.5. Reacciones de transacilación

8.6. Síntesis de antibióticos

8.7. Reacciones de protección-desprotección selectiva

8.8. Resolución de diastereoisómeros

8.9. Otras aplicaciones

9. PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS β -LACTAM ACILASAS

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS

2. MEDIOS

3. REACTIVOS

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PGA

4.1 Actividad sobre penicilina G

4.2 Actividad sobre sustratos cromogénicos

4.2.1. Actividad sobre el ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico

4.2.2. Actividad sobre los ésteres de *p*-nitrofenol

4.3. Actividad sobre fenilacetato

4.4. Actividad sobre derivados amídicos de L-leucina

4.5. Actividad sobre etil-fenilacetato

5. EFECTO DEL pH EN LA HIDRÓLISIS DEL *p*-NITROFENILACETATO

6. INFLUENCIA DEL ACETONITRILLO SOBRE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA

7. INHIBICIÓN POR FLUORURO DE FENILMETILSULFONILO

7.1. Inhibición de la hidrólisis de penicilina G

7.2. Inhibición de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato

8. INHIBICIÓN POR ÁCIDO FENILACÉTICO

8.1. Inhibición de la hidrólisis de NIPAB

8.2. Inhibición de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato

9. OTROS ESTUDIOS DE INHIBICION DE LA HIDROLISIS DE *p*-NITROFENILACETATO

9.1. Inhibición por diisopropilfluorofosfato

9.2. Inhibición por penicilina G

9.3. Inhibición por penicilina G sulfóxido

9.4. Inhibición por 6-APA

10. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS EN ESTADO ESTACIONARIO

10.1. Método de las velocidades iniciales

10.2. Método continuo

11. ESTUDIO CINETICO EN ESTADO PRE-ESTACIONARIO

11.1. Equipo de flujo detenido

11.2. Determinación del tiempo muerto del equipo de flujo detenido

11.3. Determinación de los parámetros cinéticos

12. PURIFICACION DE LA PGA

13. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

14. CUANTIFICACION DE PROTEINA

14.1. Análisis espectrofotométrico

14.2. Método de Bradford

15. AISLAMIENTO DE LAS SUBUNIDADES α Y β DE LA PGA

16. ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR

17. PREDICCION DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

18. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β -LACTAMASA

19. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA

20. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

21. OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PGA

22. TECNICA DE "WESTERN-BLOT"

23. MANIPULACION DE DNA

23.1. Transformación de *E. coli*

23.2. Obtención de plásmidos

23.3. Manipulación del DNA con enzimas de uso común en Biología Molecular

24. ELECTROFORESIS DEL DNA EN GELES DE AGAROSA

25. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA

25.1. Geles de agarosa de bajo punto de fusión

25.2. Técnica del "GeneClean"

25.3. Técnica de la β -agarasa

26. SECUENCIACION DEL DNA

27. MUTAGENESIS *IN VIVO*

28. MUTAGENESIS DIRIGIDA

29. AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR

29.1. Mutagénesis al azar mediante PCR de baja fidelidad

29.2. Mutagénesis mediante PCR utilizando un oligonucleótido degenerado

29.3. Amplificación del promotor del gen *pac* de *E. coli* y *K. citrophila*

30. AISLAMIENTO DEL RNA

31. DETERMINACION DE LOS SITIOS DE INICIACION DE LA TRANSCRIPCION. "PRIMER EXTENSION"

31.1. Método A: Marcaje del oligonucleótido con [γ - ^{32}P] ATP

31.2. Método B: Incorporación de [α - ^{32}P]dCTP

RESULTADOS

1. MODIFICACION DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA PGA

1.1. Diseño de mutantes

1.1.1. Comparación de secuencias de BLA

1.2. Estudios de modificación de la especificidad de sustrato por mutagénesis dirigida

1.2.1. Mutagénesis al azar mediante PCR

1.2.2. Mutagénesis mediante PCR empleando un oligonucleótido degenerado

1.3. Cambio de la especificidad de sustrato a través de presión selectiva

1.3.1. Obtención y aislamiento de mutantes

1.3.2. Secuenciación de los genes *pac* mutantes

1.3.3. Construcción del mutante Phe360Val por mutagénesis dirigida

1.3.4. Purificación de las PGA nativa y mutante

1.3.5. Construcción de las quimeras proteicas de las PGA nativa y mutante

1.3.6. Caracterización de la actividad enzimática del mutante ADL

1.3.7. Estudios de inhibición

1.3.7.1. Inhibición con fluoruro de fenilmetilsulfonilo

1.3.7.2. Inhibición por ácido fenilacético

1.3.8. Predicción de estructura secundaria y comparación de secuencias

1.3.9. Espectros de dicroísmo circular

2. ESTUDIO DEL MECANISMO CINETICO DE LA PGA

2.1. Estudios preliminares

2.1.1. Ensayos con *p*-nitrofenilfenilacetato

2.1.2. Ensayos con etil-fenilacetato

2.2. Búsqueda de sustratos alternativos

2.2.1. Determinación de la actividad sobre diferentes ésteres de *p*-nitrofenol

2.2.2. Determinación de la especificidad de la hidrólisis

2.2.2.1. Ensayos de actividad con extractos crudos de la enzima

2.2.2.2. Estudios de inhibición

2.2.3. Efecto del pH

2.2.4. Requerimientos estructurales de los ésteres de fenol para su hidrólisis por PGA

2.2.5. Determinación de los parámetros cinéticos en el estado estacionario Efecto del acetonitrilo en la catálisis

2.3. Estudios cinéticos en el estado pre-estacionario

2.3.1. Determinación del tiempo muerto del equipo de flujo detenido

2.3.2. Optimización de las condiciones de reacción

2.3.3. Cinéticas en el estado pre-estacionario

2.3.3.1. Dependencia de la amplitud del "burst" con la concentración de enzima

2.3.3.2. Dependencia de la amplitud del "burst" con la concentración de sustrato

2.3.3.3. Determinación de las constantes de acilación y desacilación del proceso

2.3.4. Estudios de inhibición en el estado pre-estacionario

APENDICE: Análisis cinético en el estado pre-estacionario

3. REGULACION Y EXPRESION GENICA

3.1. Regulación transcripcional

3.1.1. Estudios de inducción

3.1.1.1. Análisis de la producción de PGA por *E. coli* y *K. citrophila*

3.1.1.2. Determinación de la región promotora del gen *pac* de *K. citrophila*

3.1.1.3. Construcción de fusiones génicas

3.1.1.4. Estudios de inducción por ácido fenilacético

3.1.2. Estudios de represión catabólica

3.1.2.1. Represión catabólica por glucosa

3.1.2.2. Dependencia de CRP de la represión catabólica

3.1.2.3. Efecto del cAMP. Influencia de la represión catabólica sobre la inducción por ácido fenilacético

3.1.3. Análisis de la región -10 del promotor

- 3.1.4. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción
 - 3.1.4.1. Identificación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *K. citrophila*
 - 3.1.4.2. Identificación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli*
- 3.1.5. Localización y análisis de las secuencias promotoras
 - 3.1.5.1. Promotor del gen *pac* de *K. citrophila*
 - 3.1.5.2. Promotor del gen *pac* de *E. coli*
- 3.1.6. Efecto de la temperatura sobre la transcripción
- 3.2. Regulación postraducciona
 - 3.2.1. Influencia de la temperatura en el procesamiento postraducciona

DISCUSION

1. LA PGA COMO MIEMBRO DE UNA FAMILIA DE SERIN-ENZIMAS. DISEÑO DE MUTANTES
2. CAMBIO DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO A TRAVES DE PRESION SELECTIVA
3. CARACTERIZACION DE NUEVOS SUSTRATOS. ESTUDIO DEL MECANISMO CINETICO
4. REGULACION Y EXPRESION GENICA

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

1. CONSIDERACIONES GENERALES.

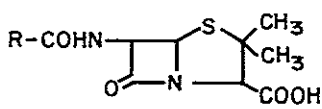
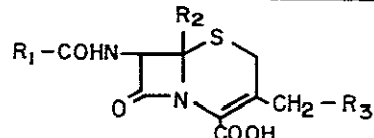
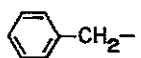
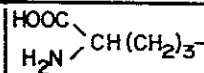
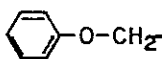
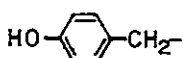
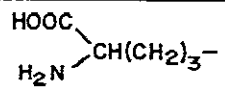
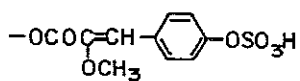
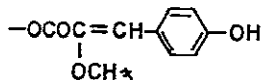
1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

El descubrimiento de Fleming (1932) del efecto antibacteriano de una sustancia producida en el caldo de cultivo de *Penicillium notatum*, a la que denominó penicilina, marca el inicio de la investigación en el campo de los antibióticos β -lactámicos. Algunos años después, Chain y col. (1940) obtuvieron una preparación de penicilina relativamente pura y demostraron su actividad antibiótica en animales. Al poco tiempo, Abraham y col. (1941) y Florey y Florey (1943), demostraron la alta eficiencia terapéutica y el bajo nivel de toxicidad que presentaba su administración al hombre.

La investigación en el campo de los antibióticos β -lactámicos ha progresado incesantemente hasta nuestros días. En un principio los esfuerzos se centraron en encontrar cepas altamente productoras de penicilinas. Mediante la fermentación de diferentes cepas de *P. chrysogenum* se obtuvieron caldos de cultivo ricos en antibióticos. Su análisis reveló que siempre se producía una mezcla de penicilinas químicamente relacionadas (tabla 1). Todas ellas presentaban un núcleo común de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y sólo diferían químicamente en la estructura de su cadena lateral de acilo. Estas variaciones ejercían una marcada influencia sobre su actividad antibacteriana. La cantidad relativa de cada una de ellas dependía de la composición del medio de fermentación, es decir, del metabolito precursor de dicha cadena lateral (Moyer y Coghill, 1946; 1947). Tras el éxito terapéutico de las penicilinas durante la Segunda Guerra Mundial, el interés de la investigación se centró inicialmente en dos aspectos: la búsqueda de nuevas penicilinas biosintéticas alternativas a la penicilina G y la optimización del procedimiento de síntesis (Behrens y col., 1948). Entre las penicilinas biosintéticas que se consiguieron, la penicilina V, la penicilina O, y la penicilina S, cabe destacar a la penicilina V por ser ampliamente utilizada debido a su mayor estabilidad en medio ácido. Sin embargo, pronto quedó demostrado que sólo los derivados monosustituídos del ácido acético podían comportarse como precursores metabólicos de la cadena lateral. Además ninguna de las penicilinas obtenidas por fermentación o por modificación química de las penicilinas biosintéticas poseían una actividad antibiótica superior a la de las penicilinas G y V.

El descubrimiento de la inactivación de las penicilinas biosintéticas por una enzima bacteriana, β -lactamasa o penicilinasas, que las transforma en ácido peniciloico supuso un interés adicional en la investigación de nuevas penicilinas (Abraham y Chain, 1940). La extensa utilización terapéutica de las penicilinas, junto a la naturaleza transferible de la resistencia a antibióticos, propició una rápida selección y proliferación de cepas bacterianas productoras de β -lactamasas y por tanto, resistentes a la penicilina.

Tabla 1 Estructura de penicilinas y cefalosporinas naturales.

PENICILINAS			CEFALOSPORINAS		
					
Nombre Genérico	R	Nombre Genérico	R ₁	R ₂	R ₃
Penicilina G		Cefalosporina C		-H	-OCOCH ₃
Penicilina V		Deacetil Cef. C	II	-H	-OH
Penicilina X		Deacetoxi Cef C	II	-H	-H
Penicilina F	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ -	A-16886 A	II	-H	-OCONH ₂
Penicilina Dihidro F	CH ₃ (CH ₂) ₄ -	A-16886 B (Cefamicina C)	II	-OCH ₃	-OCONH ₂
Penicilina K	CH ₃ (CH ₂) ₆ -	A-16884	II	-OCH ₃	-OCOCH ₃
Penicilina N		Cefamicina A	II	-OCH ₃	
		Cefamicina B	II	-OCH ₃	

La elucidación de la estructura de la penicilina N en 1955 por el grupo de Abraham sugirió que la composición de la cadena lateral afectaba no sólo a la actividad antibacteriana de las penicilinas, sino también a su espectro de actuación (Abraham y col., 1955).

Desde entonces los esfuerzos encaminados a encontrar nuevas penicilinas se centraron en dos vías: la síntesis química total y la acilación del 6-APA. Sheehan y Henery-Logan (1959) consiguieron sintetizar químicamente la penicilina V, pero el proceso resultaba muy complejo y presentaba un bajo rendimiento, no siendo rentable a nivel industrial. Por otro lado, ese mismo año el grupo de Batchelor, consiguió producir y purificar 6-APA fermentando *P. chrysogenum* (Batchelor y col., 1959). La reacción del 6-APA con cloruro de fenilacético permitió obtener penicilina G. Es decir, la introducción de la cadena lateral deseada pudo lograrse mediante un proceso químico de acilación de la molécula de 6-APA, fundamento de la producción de las penicilinas semisintéticas. Sin embargo, el proceso de fermentación, aislamiento y purificación de 6-APA resultó excesivamente laborioso, con rendimientos muy bajos.

Sakaguchi y Murao (1950) habían demostrado unos años antes que una forma alternativa de producir 6-APA de forma más rentable consistía en emplear una enzima presente en el micelio de *P. chrysogenum* y *Aspergillus oryzae*, a la que denominaron penicilina amidasa. Sin embargo, este nombre puede inducir a confusión, ya que se han descrito auténticas penicilina amidasas que hidrolizan amidas de penicilinas originando penicilina libre y amonio, actuando específicamente sobre la función carboxilo de la posición 3 del núcleo β -lactámico (Vandamme y Voets, 1974). La clasificación de esta enzima como **penicilina acilasa** (penicilina amidohidrolasa, EC 3.5.1.11) (PA) resulta más correcta. La PA hidroliza el enlace amida que se establece entre el anillo β -lactámico y la cadena lateral de acilo de las penicilinas. Aunque en un principio no se prestó mucha atención a los trabajos de Murao y Sakaguchi, el procedimiento de desacilación enzimática mediante PA cobró un especial interés como consecuencia del aislamiento de 6-APA por fermentación. A partir de entonces se llevaron a cabo intensos trabajos de búsqueda y selección de nuevos organismos productores de PA, que dieron como resultado la identificación de esta actividad enzimática no sólo en hongos sino también en bacterias, actinomicetos, levaduras e incluso en tejidos animales y vegetales (Hamilton-Miller, 1966). Así, pronto resultó evidente que el proceso de transformación de penicilina G en 6-APA proporcionaba rendimientos más elevados y permitía métodos de purificación menos complejos.

Aunque se han descrito métodos de hidrólisis química de penicilinas (Vandamme y Voets, 1974), la producción actual de 6-APA a escala industrial tiene lugar generalmente mediante el empleo de PA inmovilizada en biorreactores, sirviendo de

producto de partida las penicilinas G o V. De este modo se ha tenido acceso a una gran variedad de penicilinas semisintéticas con gran aplicación industrial (tabla 2).

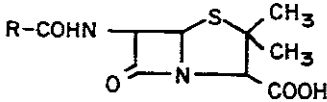
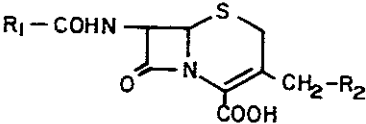
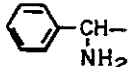
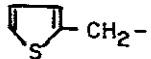
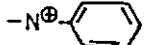
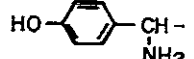
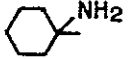
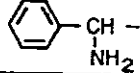
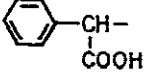
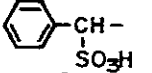
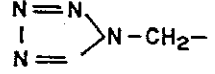
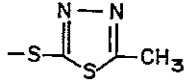
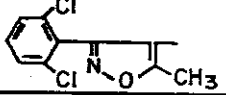
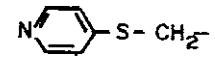
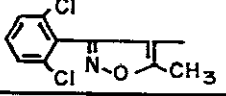
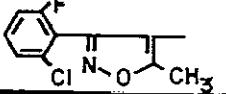
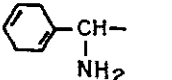
Las penicilinas semisintéticas pueden sintetizarse mediante la adición directa al 6-APA de un cloruro o anhídrido del acilo apropiado en presencia de N,N-biciclohexilcarbodiimida (Sheehan y Henery-Logan, 1959) o de cloruro de N,N-dimetilcloroforminio (Novak y Weichet, 1965). Este proceso también puede llevarse a cabo enzimáticamente, pues la PA es capaz de catalizar la reacción de síntesis (Claridge, 1960; Kaufmann, 1960; Cole, 1969d; Sudhakaran, 1985; Kasche, 1986).

Las penicilinas semisintéticas representan una mejora frente a las penicilinas naturales. Son más estables, presentan fácil absorción y menores efectos secundarios, además de representar una solución a la resistencia adaptativa microbiana a los antibióticos. Estas consideraciones, junto a la posibilidad de introducir inhibidores de β -lactamasa en las preparaciones de los antibióticos β -lactámicos, siguen marcando el interés industrial en el desarrollo de los antibióticos β -lactámicos semisintéticos (Bush, 1980)

A pesar de la similitud estructural entre penicilinas y cefalosporinas, otro grupo de antibióticos β -lactámicos, aún no se ha encontrado ninguna enzima que pueda llevar a cabo eficazmente la conversión de cefalosporina C (única cefalosporina natural, producida por el hongo *Acremonium chrysogenum*) en ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), compuesto de partida para la síntesis industrial de cefalosporinas semisintéticas (Bunnell y col. 1986). La eliminación del resto α -aminoadípilo de la cefalosporina C puede realizarse químicamente con pentacloruro de fósforo o cloruro de nitrosilo (Abbot, 1976) o mediante dos etapas sucesivas de hidrólisis enzimática con la D-aminoácido oxidasa y la glutaril 7-ACA acilasa (GLA) (Matsuda y Komatsu, 1985). La desaminación oxidativa también puede conseguirse mediante tratamiento químico (Asahi, 1978). Una vía alternativa empleada industrialmente es la producción de cefalosporinas a partir de penicilinas mediante una serie de reacciones químicas que expanden el anillo β -lactámico (Fujii y col., 1976). De esta manera se obtienen cefalosporinas con una cadena lateral de acilo que es reconocida por PA, originando el núcleo de ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA) que puede ser acilado por los métodos empleados en la obtención de penicilinas semisintéticas. En la tabla 2 se muestra un ejemplo de las penicilinas y cefalosporinas semisintéticas más representativas.

Al conjunto de enzimas capaces de producir los núcleos de 6-APA, 7-ADCA o 7-ACA, hidrolizando la cadena lateral de las penicilinas o cefalosporinas, se le denomina β -lactam acilasas (BLA).

Tabla 2 Estructura de las penicilinas y cefalosporinas semisintéticas más importantes.

PENICILINAS		CEFALOSPORINAS		
				
Nombre Genérico	R	Nombre Genérico	R ₁	R ₂
Ampicilina		Cefaloridina		
Amoxicilina		Cefalotina	II	-OCOCH ₃
Ciclacilina		Cefalexina		-H
Carbenicilina		Cefaloglicina	II	-OCOCH ₃
Surbenicilina		Cefazolina		
Cloxacilina		Cefapirina		-OCOCH ₃
Dicloxacilina		Cefacetrola	N≡C-CH ₂ -	-OCOCH ₃
Flucloxacilina		Cefradina		-H

1.2. ACTIVIDAD ENZIMATICA DE β -LACTAM ACILASAS.

1.2.1. Sustratos: Penicilinas y Cefalosporinas.

Químicamente, las penicilinas resultan de la condensación de un anillo de tiazolidina, un anillo β -lactámico y una cadena lateral de acilo (tabla 1). El núcleo de 6-APA (penam) es biosintetizado a partir de L-cisteína y L-valina, por lo que la configuración estereoquímica de los carbonos asimétricos presentes en la molécula es invariable: 3S, 5R y 6R. La desviación del átomo de nitrógeno del anillo β -lactámico con respecto al plano constituido por los sustituyentes en las posiciones 3 y 6 es de aproximadamente 0,4 Å (Page, 1984). La tensión inherente al anillo β -lactámico y la distorsión de la geometría planar del sistema bicíclico parecen ser los factores esenciales de la alta reactividad química y la actividad antibiótica de estos compuestos. Además de la estructura β -lactámica, los sustituyentes en las posiciones C3 y C6 también son factores determinantes de su actividad biológica. Así, el grupo carboxilo de C3 no puede ser sustituido, mientras que la cadena lateral de acilo de C6 es un grupo clave en la polaridad de la molécula de penicilina. A este respecto, hay que mencionar que las penicilinas son capaces de formar micelas que estabilizan la β -lactama frente a su hidrólisis (Attwood y Agarwal, 1984).

La estabilidad química del anillo β -lactámico es también un factor importante en lo que respecta a la reactividad de las cefalosporinas. Así, se ha justificado que los derivados 2-cefem sean menos activos biológicamente que los 3-cefem o las penicilinas, pues los 2-cefem son estructuras mucho más estables (Van Heyniger y Ahern, 1968). Al igual que las penicilinas, las cefalosporinas presentan una desviación del átomo de nitrógeno respecto del plano constituido por los sustituyentes del anillo β -lactámico, que corresponde a 0,32 Å en la cefalosporina C y 0,24 Å para la cefaloridina. En el núcleo 2-cefem esta distancia es de 0,06 Å, más cerca de la planaridad, lo que conlleva el incremento de la resonancia del enlace amida y, por tanto, el aumento de su estabilidad (Sweet, 1972).

Sin pretender dar una detallada descripción de la ruta de biosíntesis de las penicilinas y las cefalosporinas, sí puede ser interesante hacer algunas consideraciones generales. La biosíntesis de penicilinas en *P. chrysogenum*, así como la de cefalosporina en *A. chrysogenum* (*Cephalosporium acremonium*) comienza con la formación de un tripéptido (ACV) por condensación de los aminoácidos, L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina, que es ciclado oxidativamente para originar isopenicilina N (figura 1). Este compuesto constituye el último intermedio común en la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas. A partir de este intermedio diverge la ruta de biosíntesis de ambos tipos de antibióticos β -lactámicos. Se ha conseguido la síntesis enzimática directa de penicilina

G por ciclación *in vitro* del péptido fenilacetil-cisteinil-valina usando las enzimas de *P. chrysogenum*, *A. chrysogenum* (Luengo y col., 1986; Alonso y col., 1988) o *Streptomyces lactamdurans* (Castro y col., 1986). La síntesis de penicilina es inhibida por L-lisina debido al efecto retroinhibidor y represor que ésta ejerce sobre la expresión de la homocitrato sintetasa, enzima que cataliza la primera de las reacciones que conducen a la síntesis del ácido α -aminoadípico, y posteriormente de lisina, a partir de α -cetoglutarato. La última etapa en la biosíntesis de penicilinas consiste en la sustitución de la cadena lateral de isopenicilina N. Se han descrito dos rutas alternativas: la transacilación directa de isopenicilina N y la reacilación de 6-APA (Queener y Neuss, 1982). En ambos casos se requiere la participación de los correspondientes acil-CoA como moléculas activadas de carboxilos (Queener, 1990). En la biosíntesis de cefalosporinas el proceso es más complejo, como puede observarse en la figura 1. Los genes que codifican las enzimas que catalizan los diferentes pasos requeridos para la biosíntesis tanto de penicilinas, como de cefalosporinas, han sido clonados y expresados en *Escherichia coli*, lo que permite mejorar el conocimiento de la biología molecular de la biosíntesis, y diseñar nuevas vías biosintéticas (Aharonowitz y Cohen, 1992).

El efecto farmacológico de los antibióticos β -lactámicos reside en su acción inhibidora de la síntesis de la pared bacteriana (Park y Johnson, 1949; Collins y Richmon, 1962; Martin, 1964; Wise y Pak, 1965; Edwards y Park, 1969). Este fenómeno podría ser el resultado de la analogía estructural entre el anillo de β -lactama con el compuesto D-alanil-D-alanina (Tipper y Strominger, 1965), extremo del ácido acetilmurámico que forma parte de la estructura de la pared bacteriana. Durante el crecimiento, las cadenas de peptidoglicano son entrecruzadas enzimáticamente por la acción de la transpeptidasa. Esta enzima es capaz de reaccionar con el anillo β -lactámico para formar un intermedio acil-enzima estable. Si bien la estructura del peptidoglicano es común para las paredes celulares de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, el contenido en estas últimas es mucho menor, lo cual las hace más resistentes a la acción de penicilinas. La principal razón de la popularidad farmacológica de los antibióticos β -lactámicos es su escasa toxicidad, si bien pueden provocar reacciones de hipersensibilidad.

1.2.2. Métodos de ensayo.

El método de ensayo más empleado en la determinación de la actividad de las BLA consiste en determinar la aparición del grupo amino libre del anillo β -lactámico, que se origina tras la hidrólisis del correspondiente antibiótico que actúa como sustrato. Mediante reacciones químicas de derivatización se originan compuestos que pueden detectarse espectrofotométricamente en el mismo medio de incubación (Mahajan, 1984).

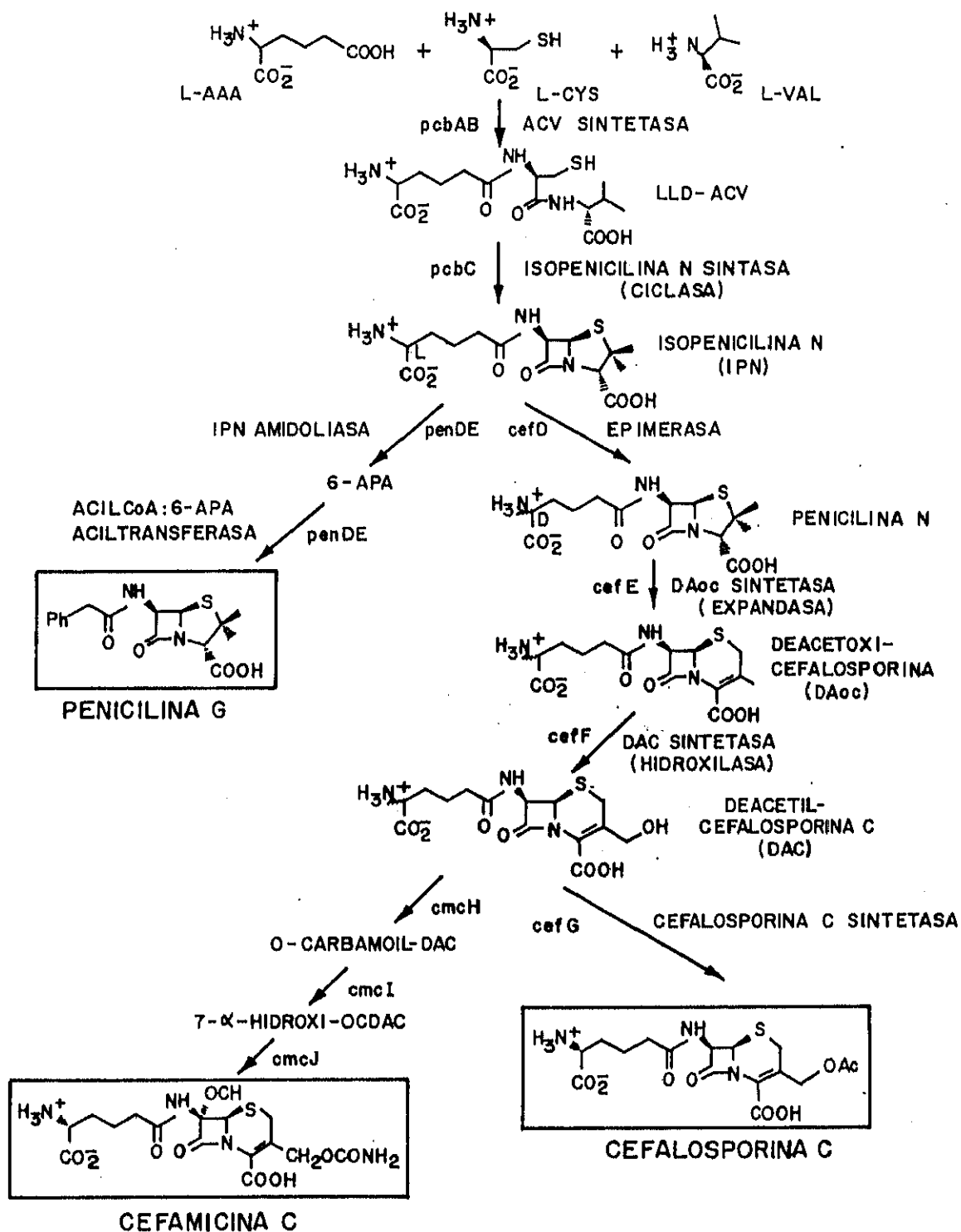


Figura 1. Ruta de biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas en bacterias y hongos.

Cabe destacar, por su amplia utilización, las reacciones con *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDAB) y fluorescamina. La reacción del grupo amino con PDAB en medio ácido conduce a la formación de una base de Schiff estable que presenta una banda de absorción centrada en torno a los 410-420 nm (Balasingham y col., 1972) y permite valorar con precisión disoluciones del amino libre en el intervalo de concentraciones comprendido entre 50 y 100 μ M. El método de la fluorescamina es aun más sensible, permitiendo valorar concentraciones de hasta 1 μ M. La fluorescamina reacciona con el grupo amino libre dando lugar a un fluoróforo con una banda de emisión en torno a 475 nm tras excitación a 390 nm (Veronese y col., 1981). El fluoróforo es estable en disolución acuosa a pH 7,8 (Baker., 1983). Aunque se ha empleado principalmente en la cuantificación de 6-APA, también ha sido utilizado para valorar 7-ACA (Reyes y col., 1989). Mucho menos empleada es la reacción con glucosamina, a pesar de que también permite la valoración espectrofotométrica de 6-APA y 7-ACA en presencia de la correspondiente penicilina o cefalosporina (Shaikh y col., 1973). Aunque estos tres métodos de ensayo son bastante rápidos y sensibles, presentan el inconveniente de la posible interferencia por la presencia de otras aminas, entre las que se encuentra el ácido peniciloico, producto de la hidrólisis por β -lactamasas. Por este motivo, resulta a veces conveniente realizar un análisis cromatográfico previo (en papel, capa fina o HPLC) con el fin de comprobar la presencia de otras aminas que pudieran falsear los resultados (Mahajan, 1984).

Alternativamente, aunque de modo mucho menos extendido, se puede valorar la actividad BLA siguiendo la liberación de la cadena lateral de acilo. Aunque esta determinación se puede realizar mediante cromatografía de gases y colorimetría (Mahajan, 1984), el método más empleado es la alcalimetría (Cole, 1969; Margolin y col., 1980). El protón procedente del ácido carboxílico formado puede ser titulado automáticamente de modo continuo mediante la adición de base, lo cual hace que este método sea muy útil en el estudio de reacciones a gran escala. La presencia de un grupo amino en la cadena lateral de la molécula de ampicilina, supone una complicación adicional de los ensayos alcalimétrico y de derivatización química, pudiéndose en este caso cuantificar el sustrato no hidrolizado mediante un ensayo específico para aminoácidos, por ejemplo, con sulfato cúprico (Plaskie y col., 1978).

La baja selectividad que presentan las BLA respecto al sustituyente amínico permite emplear como sustratos a compuestos cuya hidrólisis da lugar a la aparición de cromóforos. Entre estos sustratos se pueden citar *p*-nitroanilidas, *p*-nitrofenolatos (Margolin y col., 1980) así como N-amidas del ácido 6-nitro-3-aminobenzoico (Kutzbach y Rauenbush, 1974), cuyas hidrólisis pueden seguirse fácilmente registrando el incremento de absorbancia en torno a 400 nm. Wu y col. (1988) han mejorado la

sensibilidad del ensayo desarrollando el método del rojo timol. En algunos casos la hidrólisis de un sustrato alternativo conduce a un compuesto que, si bien intrínsecamente no presenta propiedades cromofóricas, puede ser detectado mediante una reacción colorimétrica sencilla. Este sería el caso de los N-derivados de ácido *p*-aminobenzoico, producto cuantificable por diazotación (Szewczuk y col., 1980), y de los N-acilaminoácidos y amidas sencillas, que permiten emplear el ensayo de ninhidrina para valorar la liberación de los respectivos aminoácido o ion amonio (Plaskie, 1978).

Las 7-fenilacetil-4-alkilcumarinilamidas son sustratos de la PA, y su hidrólisis libera 7-aminocumarinas con propiedades fluorescentes que permiten determinar la actividad (Scherper y col., 1986). Resulta un método muy sensible para la detección de actividad acilasa y además permite detectar la actividad *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Estos sustratos presentan como inconveniente su limitada solubilidad en solventes acuosos.

El empleo de ensayos enzimáticos acoplados ha sido una estrategia poco empleada, aunque Bauer y col. (1971) describieron un método basado en la capacidad de la PA para hidrolizar fenilacetil-L-asparagina a L-asparagina y ácido fenilacético, siendo la L-asparagina convertida en ácido aspártico y amonio mediante L-asparaginasa. El reactivo de Nessler permite cuantificar el ion amonio liberado (Daumy y col., 1985a).

En último lugar cabe reseñar el desarrollo de métodos inmunológicos para detectar actividad acilasa, como por ejemplo, el inmunoensayo descrito por Prusak y col. (1987).

2. FUENTES DE β -LACTAM ACILASAS.

2.1. METODOS DE SELECCION.

Originariamente se pensaba que las BLA se encontraban preferentemente en las cepas productoras de antibióticos β -lactámicos, idea que fue rápidamente descartada tras encontrar actividad PA en un amplio espectro de organismos conocidos. También se manejó como hipótesis de búsqueda de cepas productoras, la asociación de la actividad BLA a la resistencia o degradación de antibióticos β -lactámicos (Holt y Stewart, 1964). Sin embargo, los programas de búsqueda realizados según este criterio demostraron que la actividad BLA no está tan extendida como la actividad β -lactamasa. Por tanto, debido a los bajos niveles de expresión de las BLA y a que frecuentemente su actividad se encuentra enmascarada por las β -lactamasas, se necesitan métodos de detección muy sensibles. Los métodos de selección empleados pueden clasificarse como microbiológicos o químicos.

2.1.1. Microbiológicos.

La capacidad de crecer sobre medios selectivos ha sido extensamente utilizada para la detección de organismos productores de β -lactam acilasas. Kameda y col. (1961) propusieron un método selectivo de aislamiento de penicilina G acilasas (PGA) basado en el crecimiento sobre un medio mínimo con penicilina G como única fuente de carbono. Posteriormente, también se han aislado microorganismos productores de PGA a partir de medios de cultivo en los que las fuentes de carbono y nitrógeno eran N-acetilglicina, N-glicilglicilglicina o fenilacetamida, asumiendo que aquellos compuestos con similitud estructural a la molécula de penicilina, o a la de la cadena lateral del anillo β -lactámico, podrían emplearse como agentes selectivos en la búsqueda de microorganismos productores de BLA (Vandamme, 1973). Empleando fenoximetilpenicilina como única fuente de carbono, Vojtisek (1987) y Slezak (1987) han conseguido aislar penicilina V acilasas (PVA).

Otro de los métodos empleados en la búsqueda de microorganismos productores de β -lactam acilasas se basa en el empleo de cepas más sensibles al producto de la hidrólisis del antibiótico β -lactámico que al propio antibiótico. Este es el caso de *Serratia marcescens* que es sensible a 6-APA y comparativamente resistente a bencilpenicilina y fenoximetilpenicilina (Meevootison y col., 1983). También se han descrito cepas sensibles a 7-ACA que son resistentes a cefalosporina C y glutaril 7-ACA, como la C56 o la DSM3201, que han permitido seleccionar cefalosporina C acilasas (CCA) (Mayer y col., 1988).

La sensibilidad de determinadas cepas frente a los propios antibióticos β -lactámicos, ha sido utilizada como otro método de selección. Así, por ejemplo Kang y col. (1991), consiguieron aislar la PGA de *Bacillus megaterium* ATCC 14945, utilizando su capacidad de catalizar la reacción de acilación de 7-ADCA y D-(α)-fenilglicinametilester. Aquellos clones portadores de PGA presentaban un halo de inhibición de crecimiento en un césped de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, muy sensible al producto de la síntesis enzimática (cefalexina).

2.1.2. Químicos.

En un principio sólo se disponía de ensayos consistentes en la medida de la actividad biológica de las penicilinas como antibióticos, lo cual requería necesariamente el realizar las etapas previas de separación (normalmente mediante cromatografía en papel o en capa fina) y fenilacetilación química del 6-APA, con la consiguiente complicación y lentitud de los ensayos (Okachi y col., 1972). Aunque los bioensayos fueron pronto reemplazados por métodos químicos, alguno de éstos, como la reacción

colorimétrica con hidroxilamina (Nara y col., 1971) y la iodometría (Alicino, 1961), seguían requiriendo la eliminación de la penicilina no hidrolizada. Entre los primeros métodos químicos desarrollados cabe destacar el método basado en la reacción de biuret (Baker, 1980), que no es muy práctico pues el color se pierde rápidamente. Sin embargo, y aprovechando el hecho de que la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos supone la aparición de un grupo amino libre, los ensayos mayoritariamente utilizados empezaron a ser aquellos que emplean reacciones químicas de derivatización del 6-APA, 7-ACA o 7-ADCA, dando lugar a compuestos detectables de forma directa. Como ya se ha descrito anteriormente, de entre estos ensayos, caben destacar, por su amplia utilización, las reacciones con PDAB (Balasingham y col., 1972; Matsuda y col., 1987) y fluorescamina. (Baker, 1983, 1984). El ensayo con fluorescamina para determinar 6-APA es compatible con el ensayo de reducción cúprica para detectar la coexistencia de actividad β -lactamasa (Baker, 1992).

Con el desarrollo de las técnicas de clonación se plantea como una cuestión fundamental para agilizar el proceso de selección, encontrar métodos que permitan detectar directamente en la placa los clones productores de BLA. Walton (1964) desarrolló un método basándose en el empleo de fenilacetil *p*-nitroanilida como única fuente de carbono. Este sustrato al hidrolizarse produce un compuesto coloreado. Sin embargo, este método tiene la desventaja de ser muy poco sensible, debido a problemas de solubilidad del sustrato. Recientemente, se han desarrollado varios métodos de detección en placa que presentan las ventajas de ser muy sensibles, además de sencillos y específicos. Se basan en la utilización de filtros con reactivos específicos para la actividad enzimática que se pretende detectar. Sólo se originará color sobre aquellas colonias capaces de hidrolizar el reactivo empleado en cada caso, es decir, colonias portadoras de la actividad enzimática concreta. Por ejemplo, se emplean filtros con ácido 2-nitro-5-fenilacetamidobenzoico para detectar bacterias productoras de PGA (Zhang y col., 1986), o con ácido 2-nitro-5-(6-bromohexanoilamino) benzoico para localizar microorganismos capaces de producir CCA y GLA (Zhang y col., 1991). Otros reactivos estables para detectar CCA son las amidas δ -(α -aminoadipoílicas) (Bouvrette, 1992).

2.2. MICROORGANISMOS PRODUCTORES.

La producción de BLA no está restringida a un pequeño número de microorganismos y aparece ampliamente distribuida entre diferentes géneros. Parece ser que la producción de las BLA es una característica de cepas individuales y no se trata de una propiedad inherente a las especies (Vandamme y Voets, 1974). En la tabla 3 se mencionan diferentes organismos productores de BLA con el fin de mostrar la gran variación en sus orígenes. En un principio se pensó que las PVA eran producidas sólo

por hongos, mientras que las PGA lo eran por bacterias; hoy en día no parece ser una regla general pues se han encontrado muchas excepciones (Cole, 1964; Nara et al., 1971; Vandamme et al., 1971; Okachi et al. 1973).

Se han realizado grandes esfuerzos en la búsqueda de microorganismos productores de BLA debido a su alto valor industrial (Mahajan, 1984). Por el mismo motivo se han buscado cepas superproductoras con una alta expresión enzimática usando técnicas convencionales de mutagénesis: con luz UV, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, etilmetanosulfonato, etc. (Meevootison y Saunders, 1987; Robas y col., 1993). Recientemente, con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, la investigación se ha enfocado en la clonación de estos genes, consiguiendo mayores niveles de producción (tabla 4). Una vez clonados estos genes, todavía puede mejorarse la producción de las BLA, poniendo los genes bajo el control de promotores más fuertes (Schümacher y col., 1986; Shewale y Sivaraman, 1989; Panbangred y col., 1990; Ramírez y col., 1994). Además el conocimiento del mecanismo molecular que regula la expresión de las BLA posibilita reemplazar sus regiones nativas de regulación por otras más convenientes (Bruns y col., 1985; Oliver y col., 1985).

En cualquier programa de mejora de la producción deben figurar tres objetivos principales:

- 1.- Conseguir mutantes que no produzcan β -lactamasas.
- 2.- Aislar cepas que produzcan grandes cantidades de enzima (BLA).
- 3.- Seleccionar cepas no reprimibles por catabolito y que presenten expresión constitutiva.

Diferentes estrategias han permitido desarrollar con éxito parte de estos objetivos. En primer lugar, se han optimizado las condiciones de crecimiento para conseguir la máxima actividad enzimática empleando fermentadores a gran escala. Por técnicas genéticas convencionales se ha incrementado la producción de cepas que llevan el gen de la PA. Así, por ejemplo, Sikyta y Kyslik (1981) obtuvieron un mutante de *E.coli* 9637, que produce veinte veces más PA que la cepa parental, además de ser un productor constitutivo resistente a represión catabólica. Asimismo, Morita e Iwata (1984) consiguieron aislar un mutante hipersensible a penicilina G también hiperproductor de PA. El uso de la ingeniería genética en el desarrollo de cepas mejor productoras ha sido de gran utilidad. La estrategia más directa ha consistido en la clonación de los genes de PA en plásmidos multicopia incrementando en gran medida su producción (Mayer y col., 1979, 1980, 1981; Bruns y col., 1985; Barbero y col., 1986; Oliver y col., 1986; Schumacher y col., 1986). En otras ocasiones, los mutantes obtenidos no incrementan mucho su producción, pero presentan mayor afinidad por sustrato y menor susceptibilidad de inhibición por producto (Cecere y col., 1985). A veces,

como

Tabla.3. Organismos productores de β -lactam acilasas (cont.).

ORGANISMO	ENZIMA	ORGANISMO	ENZIMA
BACTERIAS		HONGOS	
<i>P. rettgeri</i> ATCC 9919, 9250	PGA	<i>Cephalosporium salmosynnematum</i>	PVA
<i>P. rettgeri</i> ATCC 31052	PGA	<i>C. CMI 49137</i>	PVA
<i>Bordetella</i> sp.	PGA	<i>C. acremonium</i> ATCC 11550	PVA
<i>Micrococcus</i> sp.	PGA	<i>Aspergillus niger</i> sp.	PVA
<i>M. lysodeikticus</i>	PGA	<i>A. ochraceus</i> BRL 731	PVA
<i>M. roseus</i> ATCC 516	PGA	<i>Epidermophyton interdigitale</i> , <i>E. floccosum</i>	PVA
<i>M. ureae</i> KY 3967, <i>M. luteus</i> KY 3781	PGA	<i>Trichophyton gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i>	PVA
<i>Sarcina</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Cellulomanas</i> sp.	PGA	<i>T. interdigitale</i>	PVA
<i>Kluyvera citrophila</i> KY 3641, PL-10, PL-21	PGA	<i>Alternaria</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Mucor</i> , <i>Phoma</i> , <i>Tricoderma</i>	PVA
<i>K. noncitrophila</i> KY 3642, KY 8991	PGA	<i>Pleurotus ostreatus</i>	PVA
<i>K. citrophila</i> ATCC 21285	PGA	<i>Botrytis cinerea</i>	PVA
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i>	PGA	<i>Fusarium</i> sp. 75-5	PVA
<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	PGA	<i>F. avenaceum</i>	PVA
<i>Arthobacter viscosus</i> 8895GU	PGA	<i>F. semitectum</i>	PVA
<i>B. sphaericus</i> ATCC 14577	PVA	<i>F. semitectum</i> BC 805	PVA
<i>B. plumbea</i> NRRL 3824	PVA	<i>F. conglomerans</i> AYF 254	PVA
<i>E. aroideae</i> NRRL B-138	PVA	<i>F. moniliforme</i> AYF 255, CBS 24064, CBS 44064	PVA
<i>Achromobacter</i> BRL 1755 (NCIB 9424)	PVA	<i>Gibberella fujikuroi</i>	PVA
<i>M. ureae</i> KY 3767	PVA	LEVADURAS	
<i>Pseudomonas ovalis</i> KY 3962	AMA	BRL 809, <i>Torulopsis</i> ,	PVA
<i>P. melanogenum</i> KY 3987, KY 4030, KY 4031	AMA	<i>Zygosaccharomyces</i>	PVA
<i>Acetobacter turbidans</i> ATCC 9325	AMA	<i>Debaryomyces Torula</i>	
		<i>Cryptococcus</i> , <i>Saccharomyces</i> ,	PVA
		<i>Trichosporon</i>	

Tabla 4. β -lactam acilasas clonadas.

ORGANISMO	ENZIMA	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11105	PGA	Mayer y col., 1979
<i>Kluyvera citrophila</i> ATCC 21285	PGA	García y Buesa., 1986
<i>Arthrobacter viscosus</i> 8895GU	PGA	Ohashi y col., 1988
<i>Proteus rettgeri</i> ATCC 31052	PGA	Daumy y col., 1986
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945	PGA	Martín y col., 1994
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 19018	PGA	Quax y col., 1991
<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 14577	PVA	Olsson y col., 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. GK16	GLA	Matsuda y col., 1985
<i>Pseudomonas</i> sp. SE 83	GLA (Tipo I)	Matsuda y col., 1987b
<i>Pseudomonas</i> sp. SE 83	GLA (Tipo II)	Matsuda y col., 1987b
<i>Pseudomonas</i> sp. A 14	GLA	Aramori y col., 1991b
<i>Pseudomonas</i> sp. V 22	GLA	Ishiye y col., 1992
<i>Pseudomonas</i> sp. N 176	GLA	Aramori y col., 1991b
<i>Bacillus laterosporum</i> J1	GLA	Aramori y col., 1991a
<i>Acetobacter turbidans</i> ATCC 9325	AMA	Hyun y col., 1988

ocurre con el mutante AS2 de *E.coli* IFO 13500 la mutación origina cambios en la permeabilidad de la membrana externa, lo que conlleva una disminución de Km para el sustrato, la penicilina G (Morita e Iwata, 1984).

La expresión heteróloga de los genes clonados de β -lactam acilasas ha motivado en varios casos un incremento de la producción. Ejemplos de esto los encontramos en la expresión de PVA de *B. sphaericus* en *B. subtilis* (Gattenbeck y col., 1986), o la de PGA de *K. citrophila* ATCC 21285 en *E. coli* (García y Buesa, 1986) y la de *B. megaterium* en *B. subtilis* (McCullong, 1985a y b). Como último ejemplo citar la expresión del mutante CYC1 de *P. rettgeri*, en *E. coli* JW358 (Daumy y col., 1985a y b, 1986).

Aunque se ha conseguido mejorar la producción de las BLA, el valor absoluto de actividad conseguida no es tan elevado como sería de esperar. La inestabilidad plasmídica y la saturación de los mecanismos de exportación son dos puntos que podrían justificar los resultados conseguidos. La inestabilidad de los plásmidos en sistemas de alta expresión es un fenómeno frecuente. Entre las variables que pueden contribuir a este hecho, cabe reseñar las siguientes: el propio genoma de la célula huésped, la naturaleza de la inducción, la toxicidad del producto expresado y la estabilidad de los mismos (Deretic y col., 1984; Schömer y col., 1984; Balbás y Bolívar, 1990). Para solventar este problema deben diseñarse derivados estables (Mayer y col., 1980). En cuanto a la saturación del mecanismo de exportación puede ser un problema en la producción de BLA maduras. Se piensa que el número de zonas activas de translocación es de 20.000 en *E.coli*. Este paso puede ser limitante para la exportación de proteínas con péptido señal (Ito, 1981).

3. CLASIFICACION Y LOCALIZACION SUBCELULAR.

3.1. CLASIFICACION ENZIMATICA.

La ausencia de información estructural lleva a clasificar a las BLA en base a su especificidad de sustrato. Inicialmente se clasificaron en dos grupos, denominados penicilina acilasa (PA) y cefalosporina acilasa (CA) (Sakaguchi y Murao, 1950; Hamilton-Miller, 1966; Francetic y col., 1988; Shewale y Sivaraman, 1989; Valle y col., 1991; Sudhakaran y col., 1992).

Actualmente entre las PA se distinguen tres grupos:

1 - Las penicilina G acilasas (PGA), que hidrolizan preferentemente penicilina G a 6-APA y ácido fenilacético.

2 - Las penicilina V acilasas (PVA), que hidrolizan preferentemente penicilina V a 6-APA y ácido fenoxiacético.

3 - Las ampicilina acilasas (AMA), que hidrolizan ampicilina produciendo 6-APA y ácido D(-) α -aminofenilacético.

Dentro de las CA encontramos dos tipos:

1 - Las cefalosporina C acilasas (CCA) que hidrolizan cefalosporina C originando 7-ACA.

2- Las 7- β -(4-carboxibutanamido)cefalosporánico acilasas, conocidas como glutaril 7-amino cefalosporánico acilasas (GLA). El glutaril 7-ACA resulta de la desaminación oxidativa de la cefalosporina C (Shudhakaran y col., 1992).

Algunos autores denominaron a las PVA como PA de tipo I, y a las PGA como PA de tipo II (Mahajan, 1984), aunque Abbot (1976) invirtió el orden. Las AMA corresponden al tipo III, siguiendo esta nomenclatura.

Aunque esta clasificación es de aceptación general, es importante señalar que las BLA no poseen una especificidad de sustrato absoluta, y así, por ejemplo, la PGA es también capaz de hidrolizar la ampicilina, la cefalexina, y algunas penicilinas naturales de cadena alifática (Margolin y col., 1980). Esta es la base de la subclasificación para PGA II propuesta por Desphande y col. (1994):

- PGA (tipo IIa), que hidrolizan amidas aromáticas.

- PGA (tipo IIb) que hidrolizan amidas alifáticas.

A medida que se van caracterizando las enzimas a nivel molecular, continúan apareciendo nuevas clasificaciones. Así, se distinguen al menos dos subtipos de GLA, denominados I y II, que difieren significativamente en sus secuencias (Matsuda y col., 1987). Incluso se ha propuesto también una subclasificación para las GLA en base al grado de especificidad que presentan por distintos sustratos como succinil-, glutaril-, o adipil-7-ACA (Aramori y col., 1991a; Desphande y col., 1994). Sin embargo, se debe tener en cuenta que estas subclasificaciones vienen muy condicionadas por los métodos de ensayo empleados, y por tanto, no son inequívocas. Además hay que considerar que las denominadas CCA, realmente son más activas sobre GL-7-ACA que sobre cefalosporina C, por lo que deberían denominarse GLA.

3.2. LOCALIZACION SUBCELULAR.

La localización de las BLA no responde a un patrón claro. Cuando se estudia dónde se encuentran ubicadas estas enzimas nos encontramos con una diversidad de localizaciones subcelulares, que es independiente del tipo de actividad y del tipo de microorganismo. Así, por ejemplo, las PGA de *E. coli* (Oliver y col., 1985; Schumacher y col., 1986) y *K. citrophila* (Barbero y col., 1986) se encuentran en el espacio

periplásmico, en tanto que la PGA de *B. megaterium* (Chiang y Bennett, 1967), la PGA de *A. viscosus* (Ohashi y col., 1988), y la PVA de *B. sphaericus* (Olsson y col., 1985) se secretan al medio de cultivo. En el caso de las GLA se ha comprobado que la de *Pseudomonas* GK-16 (Matsuda y Komatsu, 1985) es periplásmica mientras que las dos de *Pseudomonas* SE83 son intracelulares (Matsuda y col., 1987a, b). Todas las enzimas periplásmicas o extracelulares poseen un péptido señal implicado en el proceso de traslocación.

Si tenemos en cuenta que estas enzimas no son útiles para proteger a los microorganismos contra los antibióticos β -lactámicos, se podría pensar que su localización esta relacionada con la accesibilidad de los sustratos a los diferentes espacios subcelulares. En el caso de las enzimas intracelulares, parece evidente que los ésteres y las amidas que son sustratos de estas enzimas deben ser transportados al interior celular posiblemente por sistemas de transporte activo.

4. METODOS DE PURIFICACION.

Las BLA han sido aisladas de una amplia variedad de microorganismos y, por tanto, se han empleado muy diferentes esquemas de purificación. La PGA de *E.coli* ATCC 11105 fue la primera PGA purificada a homogeneidad y posteriormente cristalizada. En la tabla 5, aparece un resumen de las fuentes a partir de las cuales se han obtenido preparaciones, total o parcialmente puras, de enzima. Los métodos de aislamiento y purificación son discutidos con detalle por Savidge y Cole (1975) y por Vanderhaeghe (1975).

En general, el primer paso de la purificación consiste en obtener el extracto enzimático crudo. Este paso varía según la localización subcelular de la enzima. Aunque hay alguna BLA de naturaleza extracelular, la mayoría presentan localización intracelular (como hemos visto en el apartado anterior), lo que requiere su previa liberación al medio. Si se localizan en el espacio periplásmico, resulta muy ventajosa la extracción específica de las proteínas periplásmicas mediante choque osmótico (Barbero y col., 1986). Una vez obtenido el extracto enzimático crudo, la purificación se realiza normalmente mediante varias etapas cromatográficas sucesivas en las que se suelen combinar esencialmente tres principios de separación: intercambio iónico (DEAE-celulosa, carboximetilcelulosa o amberlita), penetrabilidad (Sephadex, AcA o Biogel) y adsorción (hidroxiapatito o zeolita). Se han realizado pocos intentos de aislamiento mediante cromatografía de afinidad (Mahajan y Borkar, 1984; Matsuda y col., 1987a; Ryu y Ryu, 1987). Estos métodos emplean como soportes matrices de agarosa o celulosa a las que se les acoplan diferentes ligandos que

Tabla 5. Preparaciones de β -lactam acilasas purificadas

FUENTE		ENZIMA	REFERENCIAS
BACTERIA			
<i>A. viscosus</i>	8895GU	PGA	Ohashi y col., 1988
<i>B. megaterium</i>		PGA	Chian y Bennet, 1967
		PGA	Lim y Byum, 1981
<i>E. coli</i>	NCIB 8743A	PGA	Balasingham y col., 1972
	ATCC 11105	PGA	Kutzbach y rauenbusch, 1974
	ATCC 14945	PGA	
	NCIB 8743A	PGA	Savidge y Cole, 1975
	SV	PGA	Veronese y col., 1981
		PGA	Vojtisek y col., 1980
	NCIM	PGA	Mahajan y Borkar, 1982, 1984
		PGA	Hindustan Antibiotics Ltd. 1984a,b
		PGA	Kasche y col., 1984
	PCM 271	PGA	Szewczuk y col., 1984
	AS 1.76	PGA	Jiao, Zhang y Wang, 1986
		PGA	Antibióticos S.A. 1985
		PGA	Hustedt y Papamichael, 1988
<i>P. rettgeri</i>		PGA	Roback y Szewczuk, 1981
<i>K. citrophila</i>	KY7844	PGA	Shimizu, Okachi y Nara, 1975
	ATCC 21285	PGA	Barbero y col., 1986
		PGA	Antibióticos S.A., 1985
<i>Xanthomonas</i> sp.		PGA	Petrova, Penzikova y Levitov, 1984
BACTERIA			
<i>B. megaterium</i>	14945	PVA	Meevotism y Saunders, 1987
<i>B. sphaericus</i>		PVA	Olsson y col., 1985
<i>B. subtilis</i>	pOH38	PVA	Gatenbeck y col., 1986
<i>E. aroideae</i>		PVA	Vandamme y Voets, 1975
BACTERIA			
<i>P. melanogenum</i>		AMA	Hur y col., 1987
BACTERIA			
<i>Psedomonas</i> sp.	SE83	GLA	Matsuda y col., 1987
		GLA	Asahi Chemical Industry Ltd.1987a,b
	GK16	GLA	Matsuda y Komatsu, 1985
ACTINOMICETOS			
<i>Streptovercillium</i>	No.62	PVA	Borisov y col., 1984
HONGOS			
<i>Bovista plumbea</i>		PVA	Schneider y Roechr, 1976
<i>F. semitectum</i>		PVA	Waldschmidt-Leitz y Bretzel, 1964
		PVA	Baumann, Brunner y Rochr, 1971
	BC805	PVA	Vanderhaeghe, 1975
		PVA	Vanderhaeghe, 1975
<i>F. avenaceum</i>		PVA	Lowe, Romancik y Elander, 1986
<i>F. oxysporum</i>		PVA	Vanderhaeghe, 1975
<i>Penicillium chrysogenum</i>		PVA	
HONGOS			
<i>Paecilomyces</i> sp.	C-2106	CCA	Kawate y col., 1987

puedan actuar como sustratos (o análogos) de la enzima. Sin embargo, el grado de pureza obtenido mediante estos soportes no es tan elevado como cabría esperar de una interacción altamente específica. A este respecto, Mahajan y Borkar (1984) han indicado que debido a la alta hidrofobicidad del centro activo, estos soportes funcionan preferentemente bajo el principio de separación de interacción hidrofóbica en vez de hacerlo como una cromatografía de afinidad.

Es importante tener en cuenta que algunos organismos producen más de una forma de PA (Kutzbach y Rauenbusch, 1974; Kasche y col., 1984, 1987), más de una CA (Oreshina y col., 1984; Matsuda y col., 1987b) o una PA junto a otra actividad enzimática relacionada, por ejemplo, una aminoacilasa (Borisov y col., 1984).

5. ESTRUCTURA.

Hasta 1985, la única información obtenida acerca de la estructura molecular de las BLA era la relativa a la determinación del peso molecular, punto isoelectrico, composición en subunidades y descripción de formas enzimáticas con heterogeneidad de carga. Aun así, muchos de los resultados publicados resultaban contradictorios de unos trabajos a otros, lo cual fue interpretado como que el grupo de las BLA, en realidad, estaba constituido por una gran variedad de especies enzimáticas con escasa relación estructural entre ellas. Asimismo, los datos de que se disponía sobre la naturaleza de los residuos del centro activo eran también escasos y fundamentalmente derivados de experimentos muy preliminares de inactivación enzimática por modificación química o por cambios de pH. A partir de aquel año, y gracias a la aplicación de las técnicas de ingeniería genética y secuenciación de DNA, se comenzaron a obtener los primeros resultados contrastados y fiables en relación con la caracterización estructural de estas proteínas. Las investigaciones de los grupos de Daumy en Estados Unidos sobre PA de *P.rettgeri* (Daumy y col., 1985a, b), de Schumacher y Böck en Alemania, sobre la enzima de *E.coli* (Böck y col., 1983a, b; Schumacher y col., 1986), y de Barbero y García sobre la de *K.citrophila* en España (Barbero y col., 1986), a los que se añadieron entre otros, el grupo de Komatsu en Japón con acilasas de *Pseudomonas* (Matsuda y Komatsu, 1985), han permitido demostrar que las BLA microbianas constituyen una familia de proteínas íntimamente relacionadas a nivel estructural.

Sin duda, la acilasa mejor estudiada es la PGA producida por la cepa de *E.coli* ATCC 11105. La razón de esto hay que buscarla en el hecho de ser la enzima más utilizada a nivel industrial. La PGA de *E.coli* posee una estructura inusual entre las proteínas procarióticas. La enzima se produce como un precursor inactivo, que es secretado al espacio periplásmico gracias a la presencia de un péptido señal (figura 4).

Posteriormente, este precursor es hidrolizado liberándose dos polipéptidos, denominados α y β que constituyen la enzima activa (Bock y col., 1983). Más tarde se comprobaría que el procesamiento supone la hidrólisis proteolítica por dos sitios muy próximos, liberándose un pequeño péptido de conexión o endopéptido (Schumacher y col., 1986). A continuación, se van a tratar con más detalle los aspectos estructurales y de procesamiento de las BLA.

5.1. SUBUNIDADES ESTRUCTURALES.

La PGA de *E. coli*, que como ya se ha indicado fue uno de los primeros miembros de la familia estudiados, se asumió que estaba compuesta por una única cadena polipeptídica hasta 1984 (Mahajan, 1984), a pesar de la observación de Kutzbach y Rauenbusch (1974) de que la proteína purificada presentaba dos bandas polipeptídicas en un gel SDS-PAGE. Posteriormente, Böck y col (1983a y b) y después otros grupos (Oliver y col., 1985; Bruns y col., 1985) presentaron evidencias inequívocas de la estructura heterodimérica de la PGA. Desde entonces se han caracterizado un gran número de BLA con diferentes actividades enzimáticas y de diversa procedencia, cuya composición en subunidades se indica en la tabla 6.

Hay que tener en cuenta que la contradicción en los resultados obtenidos en la determinación de los pesos moleculares y la composición en subunidades, viene condicionada por las técnicas empleadas en su determinación, que según los casos pueden corresponder al empleo de electroforesis en SDS, filtración en gel, o a partir de la secuencia nucleotídica del gen. Por ejemplo, la estructura de estas enzimas podría ser tan compacta que causaría un comportamiento hidrodinámico anómalo, con la consiguiente subestimación de su peso molecular mediante filtración en gel. Los resultados más fiables se han obtenido a partir de las secuencias de los genes que se han conseguido clonar.

La conformación activa de la gran mayoría de las PGA está constituida por dos subunidades de pesos moleculares diferentes. Se denomina subunidad α a la de menor peso molecular, que suele oscilar entre 20 y 25 kDa, y subunidad β a la que presenta mayor peso molecular, alrededor de 60-70 kDa. Las proteínas nativas tienen un peso molecular entre 80 y 90 kDa (Daumy y col., 1985a y b; Schumacher y col., 1986; Barbero y col., 1986; Ohashi y col., 1988; Quax y col., 1991; Martín y col., 1994).

Los pesos moleculares descritos de las PVA estudiadas varían entre 65 y 140 kDa. La secuenciación del gen de la PVA de *B. sphaericus* ha permitido determinar que se trata de un tetrámero de subunidades idénticas de 35 kDa (Olsson y col., 1985; Olsson y Uhlen, 1986).

Tabla 6. Estructura de β -lactam acilasas.

ORGANISMO	ENZIMA	SUBUNIDADES (kDa)		ENZIMA NATIVA (kDa)	REFERENCIA
		α	β		
<i>E.coli</i> ATCC 11105	PGA	20.5	65.0	85.5	Schumacher y col., 1986
<i>K.citrophila</i> ATCC 21285	PGA	23.5	61.5	85.1	Barbero y col., 1986
<i>A.viscosus</i> 8895GU	PGA	24.0	60.0	81.0	Ohashi y col., 1988
<i>P.rettgeri</i> ATCC 31052	PGA	24.5	66.0	90.0	Daumy y col., 1985a y b
<i>B.megaterium</i> ATCC 14945	PGA	22.8	59.0	88.2	Martin y col., 1994
<i>A.faecalis</i> ATCC 19018	PGA	23.0	61.6	89.4	Quax y col., 1991
<i>B.sphaericus</i> ATCC 14577	PVA	Homotetrámero de 35.0		140.0	Olsson y col., 1985, 1986.
<i>B.plumbea</i> NRRL 3824	PVA	n.d.		88.0	Schneider y col., 1976
<i>E.aroideae</i> NRRL B-138	PVA	n.d.		62.0	Vandamme y col., 1975
<i>F.semitectum</i>	PVA	n.d.		65.0	Walschmidt y col., 1964
<i>Pseudomonas</i> sp. GK 16	GLA	16.0	54.0	70.0	Matsuda y col., 1985
<i>Pseudomonas</i> sp SE 83	GLA (Tipo I)	38.2	19.9	58.1	Matsuda y col., 1987b
<i>Pseudomonas</i> sp SE 83	GLA (Tipo II)	25.4	58.2	83.6	Matsuda y col., 1987b
<i>Pseudomonas</i> sp. A14	GLA	28.0	61.0	89.0	Aramori y col., 1991b
<i>Pseudomonas</i> sp V22	GLA	22.0	40.0	n.d.	Ishiye y col., 1992
<i>Pseudomonas</i> sp N176	GLA	26.0	58.0	84.0	Aramori y col., 1991b
<i>B.laterosporum</i> J1	GLA	Monómero de 70.0		70.0	Aramori y col., 1991a
<i>Pseudomonas</i> BL072	GLA	24.0	65.0	n.d.	Binder y col., 1994
<i>B.megaterium</i> ATCC 53667	CCA	Tetrámero: 2de 35, 2de 47		180	Rambosek y col., 1990
<i>A.turbidans</i> ATCC 9325	AMA	70.0	72.0	285.0	Ryu y col., 1987
<i>X.citri</i> IFO 3835	AMA	Homodímero de 72.0		275.0	Kato y col., 1980a, b
<i>P.melanogenum</i>	AMA	Homodímero de 72.0		146.0	Okachi y col., 1973

Las GLA tienen pesos moleculares entre 60-90 kDa presentando una composición de subunidades similar a la de las PGA. La mayoría posee una subunidad α de 16-28 kDa y una subunidad β de 40-65 kDa (Matsuda y col., 1985, 1987a y b; Aramori y col., 1991b; Ishiye y Niwa, 1992; Binder y col., 1994). Sin embargo, se han descrito excepciones, como GLA (tipo I) en donde la subunidad α muestra mayor tamaño que la subunidad β (Matsuda y col., 1987a y b). La GLA de *B.laterosporium* J1 representa una excepción al resto de BLA, pues su estructura presenta una única cadena polipeptídica de 70 kDa (Aramori y col., 1991a).

La CCA de *B.megaterium* parece ser un heterotetrámero, con dos subunidades de 35 kDa y dos de 47 kDa, pero este resultado corresponde a un estudio cromatográfico preliminar y será necesario esperar a conocer su secuencia para confirmarlo (Rambosek y col., 1990). Lo mismo podría decirse de las AMA, que parecen ser homodímeros de 70-72 kDa (Ryu y Ryu, 1987; Kato y col., 1980a, b; Okachi y Nara, 1973).

Las subunidades α y β de las PGA se mantienen unidas mediante interacciones de carácter hidrofóbico (Daumy y col., 1985a; Lindsay y Pain, 1990). Las PGA de *E.coli* y *K.citrophila* no tienen ningún residuo de Cys (Schumacher y col., 1986; Barbero y col., 1986). La PGA de *P.rettgeri* contiene un único puente disulfuro que no está expuesto al disolvente y que no está implicado en la unión entre subunidades. La conformación activa de la proteína requiere la combinación de ambas subunidades, pues cada una de ellas por separado resulta inactiva (Daumy y col., 1985; Schumacher y col., 1986). La subunidad α se ha propuesto que determina la especificidad de sustrato del enzima, basándose en el intercambio de subunidades realizado por el grupo de Daumy (1985). En la subunidad β se localiza el residuo catalítico (Martín y col., 1991; Choi y col., 1992).

5.2. SECUENCIA.

Todas las secuencias de las BLA se han determinado mediante la clonación y secuenciación del gen correspondiente. Una lista completa de todas las acilasas que han sido clonadas puede verse en la tabla 4.

El gen que codifica para la PGA de *E. coli* ATCC 11105 ha sido secuenciado por varios grupos, siendo relativamente pocas las diferencias de secuencia encontradas entre ellos (Brüning y col., 1984; Bruns y col., 1985; Oliver y col., 1985; Schumacher y col., 1986; Valle y col., 1986; Oh y col., 1987). El gen que codifica para la PGA de *E. coli* AS 1.76, se comprobó por secuencia que era virtualmente idéntico al de *E. coli* ATCC 11105 (Guo y col., 1989). Los genes para las PGA de *E. coli* y *K. citrophila* presentan un 80% de similitud, comparable al grado de similitud que hay entre las secuencias aminoácídicas de ambos, un 87% (Barbero y col., 1986). Las secuencias de aminoácidos

de las PGA de *A. viscosus* y *B. megaterium* son también claramente similares (Ohashi y col., 1988; Martín y col., 1994).

Las GLA aisladas de las diferentes cepas de *Pseudomonas* muestran algunas regiones de similitud entre ellas y con las PGA (Matsuda y col., 1985, 1987a y b; Aramori y col., 1991b; Ishiye y Niwa, 1992). La conservación de regiones entre diferentes BLA podría estar relacionada con la importancia de estas zonas en la unión del sustrato o en la catálisis, sin descartarse que puedan tratarse de zonas implicadas en el reconocimiento de los lugares de procesamiento del precursor.

No se ha encontrado ninguna similitud de la GLA (tipo I) de *Pseudomonas* sp. SE 83, ni de la PVA de *B. sphaericus* con el resto de las secuencias (Matsuda y col., 1987a y b; Olsson y col., 1985). Resulta curioso que la GLA (tipo I) no presente ninguna aparente similitud con las otras acilasas, pues esta enzima posee una especificidad de sustrato muy similar a la GLA (tipo II).

Se podría concluir que, a través de la comparación de secuencias, se puede establecer una cierta relación entre las PGA y las GLA, si bien es difícil precisar si estas similitudes son debidas a la existencia de una acilasa ancestral común, evolución divergente, o han sido producidas por un fenómeno de evolución convergente debido a la similitud de función.

Se ha propuesto que la subunidad α de las PGA posee el sitio de reconocimiento para la cadena lateral de la penicilina G. En base a esta suposición Oliver y col. (1985) han comparado las secuencias de la subunidad α con la secuencia de aminoácidos de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs) de *E. coli* (KecK, 1985). Encontraron similitudes en la región que comprende los residuos 168-191 de la subunidad α con la región activa de las PBPs (figura 2) (Oliver y col., 1985).

Sin embargo, Prieto y col. (1990) han sugerido que la zona activa de las PBPs debería compararse con la subunidad β de las PGA. Esta sugerencia se basó en los estudios de Joris y col. (1988) que encontraron una secuencia Ser-X-X-Lys común entre PBPs y β -lactamasas, implicada en la catálisis. En la secuencia de las PGA aparece este motivo en tres regiones diferentes de la subunidad β , 372-375, 532-535 y 642-645. Prieto y col. (1990) obtuvieron mutantes en la Lys 375 que no tenían alteradas sus propiedades catalíticas, por lo que se descartó esta región como la responsable de la catálisis. Estudios posteriores han localizado la serina catalítica en la posición 290 (Slade y col., 1991; Martín y col., 1991; Choi y col., 1992; Duggleby y col. 1995).

PGA KC	<u>S</u> A E K P G Y Y Q H N G E W V K
PBP1A	<u>S</u> N I K P F L Y T A A M D K G L
PBP1B	<u>S</u> L A K P A T Y L T A L S Q P K
PBP3	<u>S</u> T V K P M V V M T A L Q R G V
PBP5	<u>S</u> L T K M M T S Y V I G Q A M K

Figura 2. Comparación de las secuencias cercanas a la serina catalítica (subrayada) de diferentes PBPs de *E. coli* (Keck y col. 1985) y la correspondiente secuencia cercana a la Ser 372 (subrayada) de la PGA de *K. citrophila* (Barbero y col. 1986). Las letras en negrita indican los aminoácidos conservados en al menos dos secuencias entre las diferentes proteínas comparadas de acuerdo a Oliver y col. (1985).

Aunque el alineamiento entre la región de la subunidad α con la región de la serina activa de las PBPs sea erróneo, no se puede descartar la importancia de la zona 168-191 de las PGA en la unión a la penicilina G. Así, la relación evolutiva entre BLA, β -lactamasas y PBPs como miembros de una superfamilia de serín-proteasas, es un tema importante que todavía no se ha estudiado. Es posible que las PGA muestren zonas similares a la secuencia Ser-X-X-Lys en ambas subunidades, ya que la unión y la hidrólisis de la penicilina G necesitan de la actuación sincronizada de las dos subunidades. Además aunque las PBPs, las β -lactamasas, y las PGA hidrolizan penicilina G, la hidrólisis de esta molécula se produce de diferente manera.

5.3. PROPIEDADES EN SOLUCION.

5.3.1. Conformación.

A partir del espectro de dicroísmo circular y de la secuencia de aminoácidos, se han realizado las predicciones de estructura secundaria y el perfil de hidrofobicidad de la PGA de *K. citrophila* (Márquez y col., 1988). La enzima madura a pH 7 contiene 11-29 % de estructura en α -hélice, 34-44 % de estructura β , 11-20 % de giros β y 26-34 % de estructura no ordenada. La PGA presenta una gran estabilidad conformacional frente al pH y la concentración de sal que podría ser debida al alto contenido de estructura β de la proteína. La predicción de estructura secundaria indica que existen cinco posibles regiones, dos en la subunidad α y tres en la subunidad β , compuestas por numerosos elementos de estructura β que podrían reagruparse en una lámina antiparalela.

La PGA de *E. coli* muestra una conformación globular, cercana a la esfericidad en solución acuosa (Lindsay y Pain, 1990). El coeficiente de sedimentación, $s_{20,w} = 5,95$ S, y el volumen específico parcial, $v_2 = 0,739$, calculados a partir de la secuencia de aminoácidos, proporcionaron un cociente de fricción $f/f_0 = 1,13$, que está en el intervalo de valores que presentan las proteínas globulares. Esta proteína es más simétrica que la PGA de *B. megaterium* que posee un coeficiente de sedimentación de 5,5 S (Chiang y Bennet, 1967). Los estudios de dicroísmo circular de la PGA de *E. coli* en la región del UV-lejano indican que esta proteína posee un 24 % de estructura en α -hélice y un 57 % de estructura β . La discrepancia en los valores respecto de la PGA de *K. citrophila* podría deberse a la diferente sensibilidad del método empleado. La estructura secundaria no se afecta significativamente por los cambios de la fuerza iónica, ni por los de pH entre 2,7 y 9,4. A pH 12 se aprecia, sin embargo, un gran cambio conformacional y se pierde la actividad enzimática de forma irreversible. Los espectros de dicroísmo circular en la región del UV-próximo muestran un alto valor de elipticidad molar por residuo entre 260

y 270 nm, cercano a 100 grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, debido a la contribución sustancial de residuos aromáticos, triptófano, tirosina y fenilalanina, característico de una estructura terciaria bien definida (Lindsay y Pain, 1990). Los estudios de cristalización de la enzima realizados recientemente han contribuido a definir con mayor exactitud la estructura de la proteína (Duggleby y col. 1995).

5.3.2. Estabilidad y desnaturalización.

Hasta hace poco tiempo, la estabilidad de las PA se discutía principalmente en relación con los fenómenos responsables de la pérdida de actividad. Por ejemplo, Berezin y col. (1975) estudiaron la estabilidad de la enzima en función del pH y de la temperatura. Posteriormente, Andersson y Hahn-Hägerdal (1987a) demostraron que la vida media de la actividad enzimática se correlacionaba con la temperatura de desnaturalización, determinada por calorimetría diferencial de barrido, y emplearon este parámetro para determinar la estabilización que se podría conseguir usando polímeros y soluciones salinas (Andersson y Hahn-Hägerdal, 1987b).

Lindsay y Pain (1990) han estudiado la reversibilidad del proceso de desnaturalización de la PGA de *E. coli in vitro*, mediante estudios de espectroscopía de fluorescencia y de dicroísmo circular, así como mediante electroforesis en gel con gradiente de urea. La enzima se desnaturalizaba en un estrecho intervalo de concentración de urea, con un punto medio en 4,5 M. La separación de las subunidades constituyentes de la proteína nativa suponía la pérdida de su actividad catalítica. Las cinéticas de desnaturalización fueron dependientes de la concentración de urea, siendo este comportamiento característico de proteínas oligoméricas estructuradas cooperativamente. Por tanto, la PGA se mostró como una enzima cuyas subunidades α y β se mantienen unidas mediante interacciones fuertemente cooperativas, de naturaleza esencialmente hidrofóbica. La ausencia de un equilibrio reversible de asociación, junto a la naturaleza cooperativa del desplegamiento son propiedades típicas de proteínas oligoméricas activadas por proteólisis (Sizmann y col., 1990). Sin embargo, la electroforesis de la PGA en geles con gradiente de urea mostró que el plegamiento de la subunidad α era reversible y rápido, mientras que la subunidad β agregaba incluso en presencia de concentraciones altas de urea. La subunidad α fue capaz de plegarse reversiblemente alcanzando una estructura bien definida, caracterizada por un porcentaje en α -hélice mayor que el de la enzima nativa. Sus propiedades físicas, radio de Stokes, coeficiente de sedimentación y coeficiente de fricción, indicaron que poseía una estructura terciaria asimétrica, que en su mayor parte era globular. Asimismo, estudios de unión a 8-anilino-1-naftalenosulfónico indican la presencia en esta subunidad de dominios hidrofóbicos. Estos resultados han llevado a los autores a sugerir que uno de estos dominios hidrofóbicos podrían constituir la zona de anclaje de la subunidad β para reconstituir la enzima nativa, durante el procesamiento del precursor. La integridad de la subunidad α se ha considerado esencial para el procesamiento de la PGA a una forma activa (Sizmann y col., 1990).

5.3.3 Renaturalización y ensamblaje.

Se han estudiado los efectos del pH, la fuerza iónica, y la temperatura en los procesos de renaturalización y ensamblaje de la PGA de *E. coli in vitro*, partiendo de las subunidades α y β desnaturalizadas (Lindsay y Pain, 1991). En condiciones óptimas, se ha conseguido renaturalizar más de un 50 % de enzima, junto a un 20 % de monómeros asociados con una conformación cercana a la de la enzima activa, pero sin actividad catalítica. La presencia de un exceso molar de la subunidad α mejoró el rendimiento del ensamblaje, lo que vino a reforzar la hipótesis de que el ensamblaje *in vitro* procede de un modo secuencial con el plegamiento inicial de la subunidad α seguido del plegamiento en su superficie de la subunidad β . El proceso de reorganización de las subunidades tras su asociación fue lento. Parece ser que el endopéptido en el precursor aumenta la probabilidad de colisión entre ambos péptidos. La dependencia de la temperatura en la producción de PGA activa observada *in vivo*, se ha explicado como consecuencia del efecto de desestabilización que se produce en el plegamiento de la subunidad α con el aumento de la temperatura. Por tanto, éste constituiría otro ejemplo más de cómo el plegamiento *in vivo* de las proteínas depende de la temperatura (King, 1986).

También se ha conseguido reconstituir la PGA de *E. coli in vivo*, partiendo de sus dos subunidades expresadas por plásmidos diferentes en la misma célula, actuando *E. coli* como huésped (Burtscher y Schumacher, 1992). La actividad se reconstituyó en el citoplasma, a diferencia del proceso normal a partir del precursor completo que se localiza en el espacio periplásmico. Esto indicaría que el transporte a través de la membrana citoplásmica es prescindible en la maduración de la proteína. La actividad enzimática alcanzó niveles muy parecidos a los de la actividad PGA nativa de la cepa empleada. Si a la subunidad α se le unía el endopéptido de 54 aminoácidos, se detectaba una disminución en los niveles de actividad conseguidos. Este hecho podría justificarse por un plegamiento de la subunidad α erróneo y ralentizado que la hiciera más accesible a la degradación proteolítica.

5.4. CRISTALIZACION.

Dada la importancia de disponer de los datos cristalográficos de las BLA para poder conocer su estructura con detalle, se ha intentado la cristalización de las acilasas desde hace ya tiempo. Los primeros grupos que lo intentaron no consiguieron resolver con éxito su estructura cristalina, sin embargo recientemente se ha mejorado su resolución.

El primer grupo que consiguió cristales regulares de una BLA fue el grupo de Kutzbach (1974) quienes lograron la formación de cristales rectangulares de PGA de *E.*

coli ATCC 11105, realizando el proceso de cristalización lentamente a temperatura ambiente tras precipitar la proteína pura con EDTA y sulfato amónico. Ichikawa y col. (1981), purificaron y cristalizaron la GLA de *Pseudomonas* GK-16, obteniendo cristales rómbicos. Posteriormente, Hunt y col. (1990), han cristalizado la PGA de *E. coli* ATCC 11105 usando polietilenglicol 8000 como agente de precipitación. Los cristales obtenidos presentan unas dimensiones de aproximadamente 0,4 x 0,3 x 0,2 mm. Ocasionalmente, se formaron cristales mayores de 7 x 2 x 1 mm, que generalmente dimerizaban y no permitían ser estudiados mediante rayos-X. El análisis cristalográfico preliminar indicó que los cristales pertenecían al grupo espacial P1. Los cristales difractaban por debajo de 2,3 Å (Hunt y col., 1990).

Recientemente se ha conseguido determinar la estructura tridimensional de la PGA de *E. coli* mediante la técnica de reemplazamiento múltiple isomorfo, con un grado de resolución de 1,9 Å (figura 3) (Duggleby y col. 1995). Los cristales obtenidos se han clasificado también dentro del grupo espacial P1. El heterodímero tiene unas dimensiones aproximadas de 70 x 50 x 55 Å. La proteína tiene forma arriñonada con una hendidura central, sus dos cadenas están entrelazadas y no muestran dominios discretos. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos mediante estudios de estabilidad de la proteína, en donde se concluyó que la asociación de las subunidades era altamente cooperativa.

6. REGULACION Y EXPRESION GENICA.

Uno de los primeros aspectos que llama la atención de las BLA es su compleja regulación. Esta difiere mucho entre los diferentes organismos en que ha sido estudiada, lo que sugiere una diversidad en la funcionalidad biológica de esta actividad enzimática.

En general, la producción de BLA se ve afectada negativamente por aquellos factores que estimulan positivamente el crecimiento de las cepas productoras, por ejemplo, una temperatura de 37 °C (Vandamme y Voets, 1974), una elevada concentración de oxígeno (Vojtisek y Slezak, 1975b) o la presencia de glucosa (Mahajan, 1984).

Los mecanismos de regulación que controlan la producción de la PGA de *E. coli*, de nuevo la más estudiada, pueden agruparse en tres principalmente: represión catabólica, inducción por ácido fenilacético y termorregulación (Vojtisek y Slezak, 1975a; Vandamme, 1981).

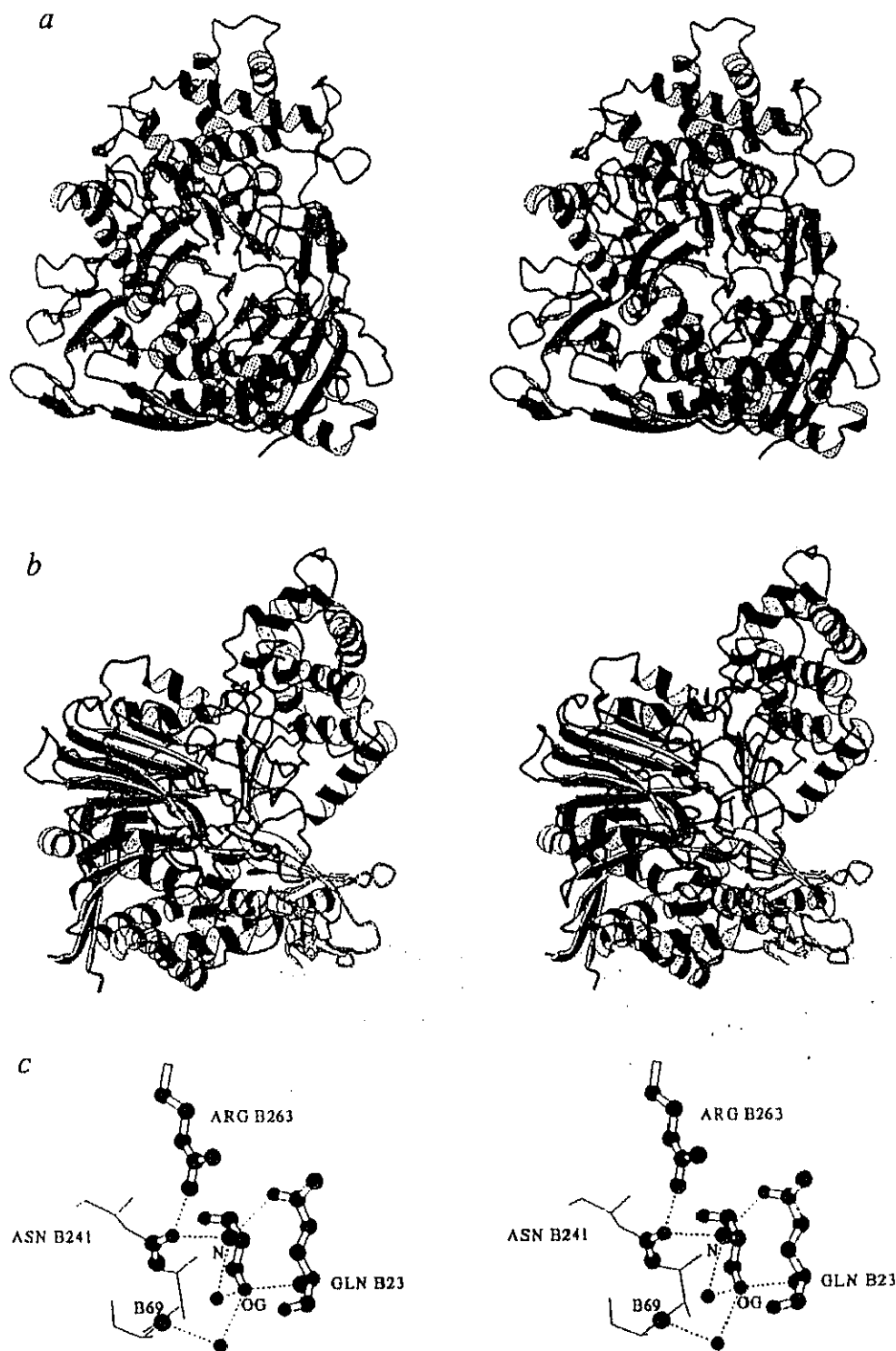


Figura 3. Estructura tridimensional de la PGA de *E. coli*. a. Representación del heterodímero. La subunidad α aparece en rojo y la β en azul. El residuo de Ser catalítica (B1) se localiza en la cavidad central formada entre las dos subunidades. b. Vista perpendicular de a. Se observa cómo la subunidad α está constituida por un anillo de seis hélices, en azul turquesa (A24-A148), seguido de otras dos hélices, en verde, localizadas en el extremo C-terminal (A153-A179). Estas últimas se entrelazan con la subunidad β . Se observa la formación de un " β -sandwich", en rojo, en donde el extremo N-terminal de la subunidad α (A3-A23), junto con gran parte de la subunidad β , se encuentra flanqueado por α -hélices de la subunidad β . En azul oscuro se indica una región helicoidal formada por la subunidad β (B294-B439). En amarillo se muestra una estructura tipo barril β , que comprende el dominio B74-B142. c. Residuos que conforman el centro activo de la PGA. La numeración de los residuos indica su posición en las subunidades α y β maduras (Duggleby y col. 1995).

6.1. REGULACION TRANSCRIPCIONAL.

6.1.1. Promotor.

La región 5' adyacente al gen que codifica para las BLA contiene secuencias que podrían estar implicadas en la regulación de la expresión génica. A nivel molecular se han indicado dos posibles regiones promotoras para el gen *pac* de *E. coli*. Valle y col. (1986) mediante experimentos de "primer extension" han determinado como punto de iniciación de la transcripción 31 ± 1 nucleótidos desde el punto de inicio de la traducción. Identificaron una secuencia -35 (TAGATA) y -10 (TAGTAT), separadas por 17 pb, que es una distancia óptima para la actividad promotora. Sin embargo, Oh y col. (1987) han propuesto una secuencia promotora diferente, que han determinado mediante experimentos de fusiones génicas. Para estos autores, el promotor estaría localizado más cerca del punto de inicio de la traducción, y aunque no lo han determinado con precisión, proponen las siguientes secuencias: -35 (TTGCTA) y -10 (TATAAC). Por tanto, queda por esclarecer cuál es el verdadero punto de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli*, así como determinarlo para las demás BLA.

La presencia de un sitio de unión a ribosoma (RBS) precediendo al codon de iniciación parece clara en la secuencia de las diferentes PGA estudiadas (Valle y col., 1986; Oh y col., 1987; Barbero y col., 1986).

Se ha encontrado una secuencia de terminación transcripcional en la región posterior al codon de terminación TAA del extremo 3' (Barbero y col., 1986; Valle y col., 1986; Guo y col., 1989).

6.1.2. Inducción.

Atendiendo a los factores de inducción podemos clasificar las BLA en dos grandes grupos: aquellas cuya expresión es constitutiva y las relacionadas con el metabolismo secundario o inducibles.

Dentro del grupo de las BLA constitutivas se encuentran, la mayoría de las PVA de origen bacteriano, por ejemplo, las PVA de *B. sphaericus* y *Acinetobacter calcoaceticus* (Mahajan, 1984). También se localiza en este grupo la PGA de *P. rettgeri*, que no se induce por ácido feniácético y cuyo mecanismo general de regulación es muy diferente al de *E. coli* (Daumy y col., 1982).

La mayoría de las PGA son enzimas inducibles, entre ellas las de *E. coli*, *B. megaterium* y *A. viscosus* (Vandamme y Voets, 1974; Ohashi y col., 1988). La PGA de *K. citrophila* no se induce cuando se expresa en este organismo, sin embargo, se induce cuando se expresa en *E. coli* (García y Buesa, 1986). También son inducibles las PVA

producidas por hongos. Por ejemplo, se ha descrito que en los hongos de los géneros *Penicillium* y *Fusarium* se induce la producción de PVA en presencia de ácido fenoxiacético (Vanderhaeghe, 1975). También se ha identificado como inducible la PVA de *B. plumbea* (Schneider y Roehr, 1976). Los mejores y más específicos inductores de las PGA (Vojtisek y Slezak, 1975a), de las PVA (Thadhani y col., 1972) y de las GLA de *Pseudomonas* (Shibuya y col., 1981) son, respectivamente, los ácidos fenilacético, fenoxiacético y glutárico.

6.1.3. Represión catabólica y efecto del cAMP.

La producción de la PGA de *E. coli* está sujeta a represión catabólica. Ejercen represión catabólica la presencia de glucosa, maltosa y glicerol en el medio de cultivo (Kaufman y Bauer, 1964; Szentirmai, 1964; Vojtisek y Slezak, 1975a y b). El efecto represor de la glucosa puede ser eliminado en presencia de cAMP (Daumy y col., 1986) que incluso es capaz de inducir por sí mismo la síntesis de la PGA de *E. coli* (Gang y Shaik, 1976).

La PGA de *K. citrophila* muestra un sistema de represión muy similar al de la enzima de *E. coli* (Okachi y col., 1972a,b, 1973; Takasawa y col., 1972). Sin embargo, la biosíntesis de la PGA de *P. rettgeri* no es reprimida por glucosa. Por el contrario, su síntesis resultó fuertemente estimulada por la presencia de compuestos de alto contenido en energía metabólica, como son la glucosa, el citrato y el glicerol, y reprimida por los ácidos dicarboxílicos C₄ del ciclo de Krebs, esto es, el succinato, el fumarato y el malato. La represión por succinato tiene lugar incluso cuando el medio de cultivo es suplementado con glucosa. Otras fuentes de carbono tales como citrato, α -cetoglutarato, aspartato y glutamato, que pueden considerarse relacionados metabólicamente con los ácidos dicarboxílicos C₄ del ciclo de Krebs, no inhiben la expresión de la PGA (Daumy y col., 1982).

Aunque aún no están completamente esclarecidas las bases moleculares del mecanismo de control de la regulación, se han encontrado dos posibles sitios de unión de la proteína receptora de cAMP, en la región 5' del promotor de *E. coli*. También hay tres secuencias palindrómicas que podrían participar en la regulación (Valle y col., 1986).

6.2. REGULACION POR TEMPERATURA.

Otra característica interesante de la regulación de la PGA de *E. coli* es su estricta dependencia de la temperatura de crecimiento. Sólo hay producción de actividad PGA entre 20 y 28 °C, tanto en la cepa productora original como en aquellas cepas hiperproductoras obtenidas por manipulación genética (Kaufman y Bauer, 1964;

Szentirmai, 1964; Francetic y col., 1988; Yang y col., 1988; Shewale y Sivaraman, 1989; Hunt y col., 1990; Zhang y Zhang, 1990). Este fenómeno no está ligado a la estabilidad de la PGA ya que la enzima es bastante estable frente a la temperatura y muestra una temperatura de catálisis óptima de 45 °C (Bondareva y col., 1969; Vandamme, 1981). En *E. coli* se han caracterizado al menos dos locus genéticos, *envY* y *ompT*, responsables de la termoregulación de varios genes. Sin embargo, ninguno de ellos es responsable de la termorregulación del gen de la PGA (Valle y col., 1991). Se ha postulado una hipótesis según la cual *E. coli* reconocería su "hábitat" por medio de su sensibilidad a la temperatura constituyéndose como parásito o como organismo libre (Nakare, 1986). Esta compleja vía de regulación aseguraría la expresión de la PA a bajas temperaturas, lo que indicaría que la bacteria está en un medio como organismo libre, para utilizar el ácido fenilacético como única fuente de carbono.

Los estudios de Oh y col. (1987) indicaban que a 42 °C se obtenía sólo el precursor de la PGA de *E. coli*, sugiriendo la existencia de un bloqueo del procesamiento postraducciona. La incapacidad de las cepas de producir enzima activa a elevadas temperaturas se ha atribuido a un plegamiento impropio de la subunidad α , que, como ya se ha descrito, parece ser la parte del polipéptido precursor que se pliega en las etapas iniciales del procesamiento (Lindsay y Pain, 1991). El precursor de las GLA es también sensible a la temperatura y se acumula en las células cuando crecen a 42 °C como la PGA (Matsuda y col., 1987a)

Hay que tener en cuenta que a este nivel no todas las PGA son igual de estrictas en su dependencia de la temperatura. Por ejemplo, se ha visto que la producción de PGA por cepas de *E. coli* recombinantes que contengan la PGA de *E. coli* ATCC 11105 fue más sensible a la temperatura que aquellos recombinantes que expresaban la PGA de *K. citrophila* (García y Buesa, 1986). La PGA de *P. rettgeri* tampoco está sujeta a un control estricto de la temperatura (Daumy y col., 1982).

Recientemente Keilman y col. (1993) han estudiado más a fondo este fenómeno llegando a la conclusión de que a temperaturas superiores a 30 °C la transcripción del gen se produce correctamente pero se desacopla el transporte de la PGA y la traducción del mensajero. La distancia entre la región de unión al ribosoma y el AUG, así como la conformación del péptido naciente, son importantes factores que contribuyen a la termorregulación. Se ha propuesto que la ausencia de traducción a temperaturas elevadas evitaría la acumulación de precursor unido a la membrana incompetente para la translocación.

6.3. PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL.

Como ya se ha mencionado, las BLA son sintetizadas como proproteínas inactivas, que sufren un procesamiento proteolítico generándose las dos subunidades que componen la enzima activa. El polipéptido precursor de las PGA de *E. coli* y *K. citrophila*, las primeras BLA estudiadas, comprende cuatro dominios estructurales que se disponen en el siguiente orden desde el extremo N-terminal: el péptido señal, la subunidad α , el endopéptido y la subunidad β (Barbero y col., 1986; Schumacher y col., 1986). Cada uno de estos dominios juega un papel importante en el transporte y en el procesamiento.

El mecanismo de procesamiento postraducciona ha sido estudiado por muchos investigadores (Schumacher y col., 1986; Barbero y col., 1986; Böck y col., 1983b; Oliver y col., 1985; Bruns y col., 1985; Ohashi y col., 1988; Daumy y col., 1985a y b; Linsay y Pain., 1990, 1991; Sizmann y col., 1990). El proceso de formación de la enzima activa comprende la siguiente etapas:

- 1.- Síntesis del polipéptido precursor que contiene los cuatro dominios estructurales: péptido señal, subunidad α , endopéptido y subunidad β .
- 2.- Transporte del polipéptido precursor al espacio periplásmico y posterior eliminación del péptido señal.
- 3.- Ruptura proteolítica del extremo N-terminal de la subunidad β .
- 4.- Eliminación del endopéptido del extremo C-terminal de la subunidad α a través de un procesamiento proteolítico secuencial en dos o tres pasos.

El procesamiento de las PGA es inusual en proteínas procarióticas, si bien, es conocido que constituye el mecanismo de activación de proteínas virales, así como de muchas hormonas y enzimas de organismos eucariontes (Douglass y col., 1984). Otros ejemplos de procesamiento postraducciona de precursores polipeptídicos son raros en bacterias. Podría citarse como ejemplo la subtilisina de *B. subtilis*, pues la formación de la enzima madura implica la ruptura de una prosequencia, que sirve para asegurar el plegamiento correcto de la enzima, y que no forma parte de la enzima madura activa (Ikemura y col., 1987; Power y col., 1986; Zhu y col., 1989). Otros ejemplos serían el procesamiento de las α - y β -amilasas de *B. polymyxa*, cuyo precursor exhibe ambas actividades, que se independizan tras el procesamiento (Uozumi y col., 1989), o el procesamiento del complejo citocromo bc₁ de *Bradyrhizobium japonicum* (Thöny-Meyer y col., 1989).

6.3.1. Péptido señal.

La localización periplásmica de la mayoría de las PA bacterianas precisa que estas proteínas sean transportadas a través de la membrana plasmática una vez han sido sintetizadas. En procariontes, todas las proteínas extracitoplásmicas conocidas son inicialmente sintetizadas en el citoplasma y poseen una región extra N-terminal, denominada péptido señal, que es esencial para que la translocación se produzca (Vlasuk y col., 1984). La localización de los sitios de procesamiento dentro de la secuencia del gen que codifica para las PA ha determinado que también en este caso exista un péptido señal implicado en el transporte del precursor.

La función de estos péptidos en el proceso de secreción no está aún del todo esclarecida a nivel molecular, aunque sí parece claro que facilita la asociación de la proteína a la membrana antes de la translocación. El reconocimiento e inserción del péptido señal en la membrana se ha propuesto que puede ocurrir según dos mecanismos alternativos:

a) Ensamblaje libre, durante el cual la proteína sufre cambios conformacionales al pasar de un entorno acuoso a otro lipídico (Wickner, 1979).

b) A través de proteínas de membrana específicas que reconocen al péptido señal, uniéndose a él y orientando y conduciendo a la proteína naciente a través de la bicapa lipídica (Blobel y Dobberstein, 1975).

Ambas hipótesis no son excluyentes y, de hecho, se han propuesto nuevas hipótesis que no son más que combinaciones de los dos mecanismos anteriores (Perlman y Halvorson, 1983). Se han propuesto unas propiedades comunes a los péptidos señal. Estos constarían de un núcleo hidrofóbico de unos doce aminoácidos, que suele venir precedido de un residuo cargado positivamente (lisina o arginina) y terminar con una secuencia de alta probabilidad de giro β o con un residuo cargado. En las posiciones siguientes se observa la secuencia Ala-X-Ala, que es la señal más frecuente que precede a una ruptura proteolítica (Perlman y Halvorson, 1983).

El extremo N-terminal de los precursores de PA presenta las propiedades típicas de los péptidos señal. Está constituido por 26 aminoácidos, por lo que sería uno de los péptidos señal conocidos más largo. El núcleo hidrofóbico, estaría formado por 14 residuos y se extendería desde la posición 7 (metionina) a la 20 (serina en la PGA de *K. citrophila* y triptófano en la PGA de *E. coli*). Comparando entre sí los péptidos señal de ambas PAs, se observa que aunque los extremos N- y C-terminal son idénticos, existen diferencias dentro del núcleo central que, no obstante, continúa siendo hidrofóbico en ambos casos. A pesar de las diferencias entre los extremos N-terminal de la subunidad α , las dos proteínas presentan una alta probabilidad de giro β en esta zona (Barbero y col., 1986; Márquez y col., 1988), tal y como sucede en otras proteínas de secreción

(Vlasuk, 1984). Otra diferencia estriba en que el punto de corte es Ala-Glu en la PGA de *E.coli* y Ala-Ala en la PGA de *K.citrophila*.

Los estudios de Schumacher y col. (1986) mostraron que la eliminación del péptido señal conduce a la acumulación del precursor en el citoplasma, donde no presenta procesamiento proteolítico, y por tanto, no genera proteína activa. Sin embargo, Choi y col. (1992) han observado que la ausencia de péptido señal no elimina totalmente la producción de PGA activa. Sus resultados indican que se bloquea totalmente el procesamiento de la subunidad α y disminuye la eficiencia del procesamiento de la subunidad β , aunque la causa de este fenómeno no es clara.

6.3.2. Procesamiento de las subunidades.

Sizmann y col. (1990) han estudiado en detalle los requerimientos de la estructura primaria para la maduración *in vivo* de la PGA de *E. coli* ATCC 11105. Para realizar este estudio construyeron una colección de polipéptidos precursores mutantes con inserciones y deleciones en los diferentes dominios estructurales. Como resultado de este análisis se han podido extraer interesantes conclusiones acerca de la importancia de cada dominio estructural.

Se ha encontrado que la región del endopéptido debe presentar un tamaño adecuado para que se produzca el procesamiento. Una pequeña distorsión de la estructura del endopéptido todavía permite un procesamiento correcto, aunque con menor eficiencia. Por ejemplo, al insertar el tetrapéptido Ala-Asp-Pro-Arg, se pudo recuperar un 49 % de actividad acilasa. Sin embargo, la extensión del endopéptido con 24 aminoácidos adicionales bloqueó completamente el procesamiento del precursor que se acumuló de forma estable en la célula. Al deleccionar 43 residuos del extremo N-terminal, dejando sólo 11 aminoácidos, se detectaron cortes proteolíticos inespecíficos (Sizmann y col., 1990). El péptido espaciador se cree que determina una conformación adecuada para el plegamiento correcto de las subunidades, al mantenerlas unidas covalentemente (Oliver y col., 1985).

El extremo C-terminal de la subunidad β se definió como una zona absolutamente necesaria en el proceso de maduración. La inserción del tetrapéptido Ala-Asp-Pro-Arg en este extremo, bloqueó por completo la formación de PGA activa. El precursor se localizó asociado a la fracción de membrana, lo que sugería un defecto en la translocación. Esta interpretación se corroboró posteriormente al estudiar los efectos de las deleciones en esta zona. Si se eliminaban tres residuos había procesamiento, pero era eficiente. Si la deleción comprendía 6, 9, 11 ó 19 aminoácidos se bloqueaba la eliminación del endopéptido, aunque parecía que el péptido señal sí se había eliminado.

Deleciones internas en la subunidad α , los 19 aminoácidos entre las posiciones 95 y 113, permitieron detectar trazas de actividad enzimática, lo que podría indicar que se habría producido una conformación inestable de la proteína con una rápida degradación proteolítica. El efecto de las deleciones en la subunidad β fue diferente, pues aunque se detectó ruptura del péptido señal, no se detectó proteína madura. El precursor parecía no ser susceptible a degradación proteolítica, siendo estable.

El grupo de Choi (1992) ha continuado el estudio de los requerimientos estructurales para el procesamiento del precursor de la PGA de *E. coli* ATCC 11105. Su estudio se ha basado en el seguimiento *in vivo* del precursor con mutaciones puntuales en diferentes puntos de ruptura. Tras cambiar los aminoácidos que constituyen el punto de ruptura de la subunidad α , observaron que aquellos cambios que no introducen modificaciones estructurales significativas no alteran el procesamiento. Sin embargo, una sustitución con aminoácidos con tendencias estructurales muy diferentes, como introducir una prolina rompiendo α -hélice, interrumpe el procesamiento de la subunidad α , aunque no afecta al procesamiento de la subunidad β ni a la actividad enzimática. Las diferentes sustituciones efectuadas en el punto de ruptura de la subunidad β permitieron ver que existía una relación directamente proporcional entre el grado de procesamiento de la misma y el porcentaje de actividad enzimática. El procesamiento de la subunidad β parece transcurrir previo al de la α . Cuando el residuo Ser290 se mutó a Cys, el precursor se procesó pero no se detectó actividad enzimática. Esto sugiere que los requisitos estructurales para el procesamiento difieren de aquellos necesarios para conseguir actividad enzimática. La Ser290 había sido previamente identificada, por estudios de modificación química, como el residuo catalítico de las PA (Slade y col., 1991; Martín y col., 1991).

Se ha determinado que en la subunidad β de la PGA de *K. citrophila*, el cambio de la Gly310 por Glu impide el procesamiento del precursor, aunque no evita la translocación al espacio periplásmico. Este cambio sólo introduce ligeras variaciones de estructura secundaria, pero la introducción de un residuo cargado en esta posición impide que el precursor adopte la estructura requerida para el procesamiento proteolítico. El triplete Gly310-Pro311-Gln312 está muy conservado entre diferentes acilasas, lo que podría sugerir que estos residuos desempeñan un importante papel estructural (Prieto y col., 1992).

De estos estudios se puede deducir que lo que parece verdaderamente importante en el reconocimiento de los sitios de ruptura del precursor no es tanto su secuencia como ciertos elementos estructurales, de la misma manera que ocurre con otras proteínas (Warren, 1987).

La similitud estructural de todas las PGA clonadas y secuenciadas (Daumy y col., 1985a y b; Barbero y col., 1986; Schumacher y col., 1986; Ohashi y col., 1988; Quax y

col., 1991; Martín y col., 1995) podría relacionarse con una similitud en el proceso de maduración, previsiblemente análogo al de la PGA de *E. coli* para todas. El precursor de las GLA de *Pseudomonas* sp. también origina dos subunidades de forma similar a las PGA, aunque sin embargo, carecen de endopéptido (Matsuda y Komatsu, 1985; Matsuda y col., 1987a y b; Aramori y col., 1991a y b). Por tanto, el plegamiento adecuado para el procesamiento de las subunidades debe estar mediado por otros factores que no han sido determinados todavía. Los péptidos señal de las GLA de *Pseudomonas* sp. GK 16, *Pseudomonas* sp. A14 y *B. laterosporus* tienen 29, 28 y 27 residuos respectivamente, y se supone que su procesamiento debe ser similar al de las PGA (Matsuda y Komatsu, 1985). Sin embargo, las GLA de *Pseudomonas* sp. SE 83, N176 y V22 no presentan péptido señal, y hoy en día, no se conoce el mecanismo exacto del procesamiento proteolítico de sus precursores. La PVA de *B. sphaericus* posee una estructura cuaternaria diferente de las PGA y de las GLA, siendo un tetrámero con subunidades iguales de 35 kD. Su gen se ha clonado y secuenciado, observándose que carece de una región codificadora de un posible péptido señal, lo cual era de esperar dada su localización citoplásmica (Olsson y Uhlen, 1986).

6.3.3. Modelo de procesamiento *in vivo*.

Estudiando las cinéticas del procesamiento del precursor de la PGA de *E. coli* *in vitro* se vio que la subunidad β era detectada antes que la subunidad α , cuya aparición, a su vez, era precedida por la de dos péptidos de 29 y 27 kDa (Schumacher y col., 1986). Por otro lado, Bruns y col. (1985) encontraron que la secuencia C-terminal de la subunidad α presentaba heterogeneidad mientras que Kutzbach y Rauenbush (1974) describieron la existencia de distintas PGA que diferían en sus puntos isoeléctricos. A la vista de estos resultados se ha propuesto un procesamiento del precursor de la PGA de *E. coli*, que debe ser similar en otras BLA (figura 4). Una vez que el péptido β es liberado del precursor por ataque endoproteolítico, se obtiene la subunidad α por sucesivas proteólisis a partir del extremo C-terminal, pasándose por especies intermedias que darían cuenta de la heterogeneidad anteriormente citada.

Uno de los problemas más interesantes todavía por resolver es el de determinar las enzimas proteolíticas responsables del proceso de maduración de las BLA. Se han manejado tres hipótesis. La primera de ellas se basa en la existencia de proteasas específicas que reconocen inequívocamente los puntos de ruptura en el precursor. Se ha observado que el precursor de la PGA de diferentes procedencias, es correctamente procesado en todas las estirpes de *E. coli* transformadas, e incluso en *P. putida*, aunque no poseyeran la actividad enzimática antes de ser transformadas (Daumy y col., 1986; Barbero y col., 1986).

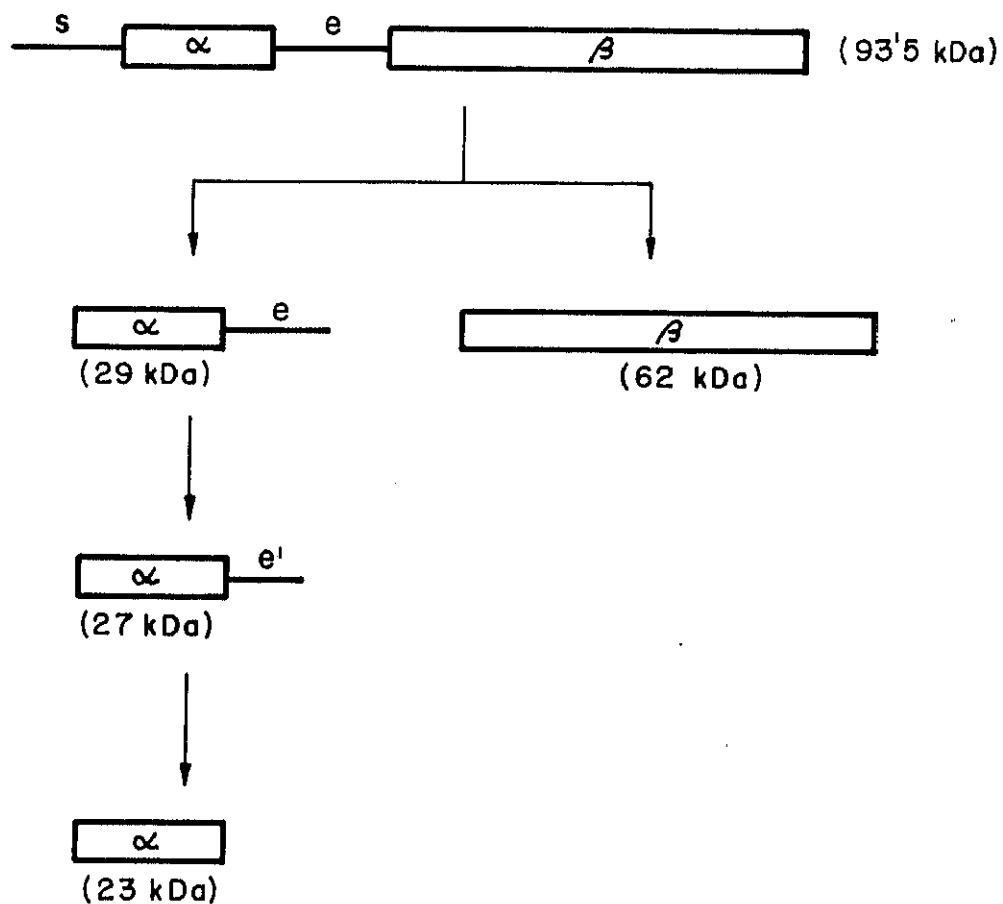


Figura 4. Fases del procesamiento post-traduccion de la penicilina G acilasa de *E. coli* (Sizmann y col. 1990). s, péptido señal; e y e', endopéptido sin procesar y parcialmente procesado, respectivamente; α y β , subunidades α y β de la PGA.

Esto no parece coherente con la hipótesis inicial. Parece más razonable asumir que el sistema de proteólisis implicado podría intervenir también en otros procesos fisiológicos. Si estas proteasas se localizasen asociadas a la membrana citoplásmica se entendería que el procesamiento estuviera acoplado a la translocación. La tercera de las hipótesis sugiere la posibilidad de que el procesamiento resultara de una actividad autoproteolítica del mismo precursor durante la traslocación. En este sentido, hay que indicar que se ha encontrado la autoproteólisis de la PGA de *P. rettgeri* en ausencia de urea (Daumy y col., 1985a). Además, el procesamiento de la proproteína de la subtilisina transcurre mediante un mecanismo intermolecular de autocatálisis (Power y col., 1986; Zhu y col., 1989). Se puede proponer, por tanto, que cuando el precursor es integrado en la membrana durante su translocación, se producen los reajustes estructurales que exponen los puntos de corte susceptibles a proteasas inespecíficas, o bien que inducen la autocatálisis.

7. ASPECTOS CINETICOS.

7.1. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO.

La especificidad de sustrato de las PGA procedentes de muy variados microorganismos ha sido uno de los aspectos más extensamente estudiados (Huang y col., 1963; Cole, 1964, 1969a, b y c; Vojtisek y Slezak, 1975c; Plaskie y col., 1978; Margolin y col., 1980). No obstante, son pocos los trabajos en los que se han determinado de un modo riguroso los parámetros cinéticos de la reacción (K_m y k_{cat}), y de aquí que sea difícil comparar y correlacionar todos los resultados obtenidos. Uno de los primeros estudios en la determinación de la especificidad de sustrato lo realizó Cole (1969a) empleando preparaciones enzimáticas de PGA de *E.coli* sin purificar. Posiblemente, la presencia de membranas durante el análisis creó problemas en la difusión de los sustratos, lo que justificaría que los valores de K_m para la penicilina G fuesen mayores que los calculados posteriormente con la enzima pura. El mismo problema explicaría los elevados valores de K_m y K_i obtenidos por el grupo de Schömer y col. (1984) con células enteras.

Desde los primeros estudios se puso de manifiesto que el resto acilo de la molécula de sustrato era más crítico en el reconocimiento por la enzima que el resto amino (Hamilton-Miller, 1966). El estudio de la desacilación de diferentes moléculas de penicilina indicó que la *p*-hidroxibencilpenicilina (penicilina X) es el mejor sustrato en cuanto a su constante de especificidad, seguido de la bencilpenicilina (penicilina G), DL- α -hidroxibencil-, 2-furilmetil-, 2-tienilmetil-, D- α -aminobencil- (ampicilina), *n*-

propoximetil- e isobutoximetil-penicilina. La fenilpenicilina y la DL- α -carboxibencilpenicilina no son sustratos, en tanto que la fenoximetilpenicilina (penicilina V) es hidrolizada con muy baja eficiencia. La naturaleza del núcleo β -lactámico no constituye una barrera para la PGA ya que es capaz de hidrolizar con alta eficiencia las cefalosporinas equivalentes (Cole, 1969a), aunque no hidroliza cefalosporina C (Shimizu y col., 1975).

Esta enzima es también activa sobre otros sustratos distintos a las penicilinas o cefalosporinas, y puede hidrolizar fenilacetamida o las fenilacetamidas de L-aminoácidos, así como las amidas de otras cadenas laterales de las penicilinas anteriormente nombradas. La benzamida y la β -fenilpropionamida no son sustratos. Aunque la mayor especificidad de esta enzima se manifiesta para las fenilacetamidas, algunas amidas alifáticas que presentan cadenas de longitud similar al ácido fenilacético, como por ejemplo la valeril- y hexanoilamida, también pueden ser hidrolizadas (Cole, 1969b).

La PGA presenta una actividad enzimática estereoespecífica, siendo los isómeros L de fenilacetil-aminoácidos y de fenilacetil-amino- β -lactamas hidrolizados más rápidamente que sus correspondientes isómeros D. Sin embargo, cuando el sustrato porta un núcleo de 6-APA o 7-ADCA la preferencia enantiomérica cambia y la enzima hidroliza mejor los isómeros D (Cole, 1969a y b; Plaskie y col., 1978). Resulta interesante que, a pesar de la baja especificidad que presenta la PGA para el resto amino del sustrato, ni el sulfóxido ni la sulfona de penicilina G son hidrolizados por la enzima (Plaskie y col., 1978). Esencialmente, la enzima muestra la misma especificidad cuando cataliza la reacción de síntesis de penicilinas y otros compuestos fenilacetilados (Cole, 1969c).

Es importante señalar que la enzima actúa también como una esterasa, hidrolizando distintos ésteres del ácido fenilacético, así como los ésteres equivalentes a las amidas antes citadas (Cole, 1969b). Konecny y col. (1983) han estudiado la hidrólisis de un sustrato que no sigue los patrones estructurales previamente descritos, el metiléster del ácido cianoacético (Konecny y col., 1983).

Kasche y col. (1984) indicaron que el centro activo de la PGA posee un sitio de unión específico para 6-APA adyacente al sitio de unión de la cadena lateral de acilo. Estos mismos autores, a partir del estudio del efecto de la fuerza iónica sobre las constantes cinéticas de la reacción, sugirieron que la interacción es de tipo iónico y se establece entre el carboxilo desprotonado del 6-APA y un residuo de la enzima cargado positivamente. Con todo esto, se puede concluir que, la unión del resto amino del sustrato en el centro activo sí tiene lugar de un modo específico, aunque no resulta, en general, tan clave para el mecanismo de catálisis como la unión del resto ácido, posiblemente porque éste, al ser el segundo producto saliente, participa en más etapas cinéticas.

Sobre la especificidad de sustrato de las otras BLA se conoce mucho menos. En un principio se creyó que la PVA de *F. semitectum* era activa sobre fenoximetilpenicilina y sobre aminoácidos derivados (Walschmid-Leith y Bretzel, 1964). Sin embargo, tras purificar la enzima se ha separado la actividad aminoacídica de la PVA (Baumann y col., 1971). La PVA de *B. plumbea*, una vez pura, ha mostrado gran especificidad para la penicilina V y sus *p*-hidroxi derivados (Schneider y Roehr, 1976). La PVA de *E. aroideae* muestra una actividad específica muy dependiente del pH. A pH 5,6 sólo hidroliza penicilina V, mientras que a pH 8,0 solamente hidroliza cloxacilina y meticilina, pero no penicilina V (Vandamme y Voets, 1975). Por tanto, las PVA parecen tener un grado mayor de especificidad que las PGA. Las AMA reconocen específicamente la ampicilina como sustrato y no pueden hidrolizar las penicilinas G o V (Ryu y Ryu, 1987 y 1988; Kato y col., 1980a y b). Las GLA, a parte de hidrolizar el glutaril-7-ACA, también muestran cierta actividad sobre el succinil- y adipil-7-ACA, y lo que es más importante, algunas GLA son capaces de hidrolizar la cefalosporina C, aunque con muy baja eficiencia. Igual que sucedía con las PGA, estas enzimas pueden actuar sobre ambos tipos de núcleos β -lactámicos, hidrolizando tanto los ésteres como amidas de los correspondientes ácidos de las cadenas laterales que reconocen en las cefalosporinas (Matsuda y Komatsu, 1985; Matsuda y col., 1987a; Vandamme, 1988; Aramori y col., 1991a y c).

7.2. CENTRO ACTIVO.

Aunque hace algún tiempo que se había cristalizado la PGA de *E. coli* (Kutzbach y Rauenbusch, 1974; Hunt y col. 1990) estableciéndose incluso algunas coordenadas moleculares (Hunt y col. 1990), la estructura tridimensional de esta enzima se ha publicado recientemente (Duggleby y col. 1995). Por ello, todos los datos referentes al centro activo que hasta ahora se tenían procedían de distintas aproximaciones bioquímicas y genéticas. La mayor parte de los estudios dirigidos a la identificación de residuos del centro activo corresponden a estudios de modificación química basados en la inactivación de la enzima mediante reactivos específicos de grupo. Hay que indicar, que salvo en algunos casos, estos trabajos sólo aportaron información preliminar (Mahajan, 1984). Uno de los datos más significativos en este sentido es la inhibición equimolecular irreversible que se produce en presencia del fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), conocido inhibidor de serín-proteasas (Kutzbach y Rauenbusch, 1974). El PMSF inactiva totalmente las PGA por modificación covalente de un único residuo de la enzima. Sin embargo, el hecho de que otros inhibidores de estas proteasas, como el fluoruro de diisopropilfosfato, no inactiven la enzima sugiere que la inactivación por PMSF se debe a su homología estructural con el ácido fenilacético y que la accesibilidad

del residuo de serina que se modifica hacia otros inhibidores está restringida (Siewinski y col., 1984). La cinética de la inactivación por PMSF indica que se trata de una inhibición competitiva y se produce inmediatamente después de la adición del inhibidor (Shvydas y col., 1977). La reacción con PMSF es, por lo tanto, un método ideal para titular el número de centros activos de las PGA.

Los primeros estudios llevados a cabo para determinar el residuo responsable de la inactivación por PMSF indicaban que éste se encontraba en la subunidad β (Daumy y col., 1985a). Posteriormente, por medio de mutagénesis química se demostró que el residuo catalítico era la serina localizada en el extremo N-terminal de dicha subunidad β (Slade y col., 1991; Martín y col., 1991). Estos resultados han sido confirmados recientemente por mutagénesis genética (Choi y col., 1992).

Otros estudios, tal vez menos precisos pero no por ello menos interesantes, se han realizado para determinar la implicación de las dos subunidades en la especificidad de sustrato. Daumy y col. (1985a y b) consiguieron obtener PGA mutantes capaces de hidrolizar compuestos conteniendo cadenas laterales distintas al ácido fenilacético. Una vez separadas y renaturalizadas las dos subunidades, α y β , de la PGA construyeron acilasas quiméricas en las cuales la especificidad de la cadena lateral estaba ligada a la subunidad α . Williams y Zuzel (1985) encontraron que el residuo Met168 era importante en la determinación de la especificidad de sustrato de la PGA de *E. coli*, pues el cambio Met168Ala aumentaba la actividad sobre 6-bromohexanoil-6-APA, mientras que la constante de especificidad para la penicilina G, la penicilina V y el ácido fenilacetil-4-aminobenzoico disminuían. Se ha estudiado asimismo el efecto de las siguientes mutaciones en la PGA de *K. citrophila*: Met168Ala, Met168Val, Gly166Asp, Lys375Asn y His481Tyr. Las mutaciones en la Met168 aumentaban la constante de especificidad de la enzima para la penicilina G, la penicilina V y el ácido fenilacetil-4-aminobenzoico, y además disminuían la sensibilidad a PMSF (Prieto y col., 1990). El estudio del perfil termodinámico del mutante Met168Ala indicó que la Met168 participa en la estabilización del estado de transición y del complejo enzima-sustrato. Por tanto, este residuo está implicado en la interacción con el sustrato aunque no participa en la catálisis (Martín y col., 1990). El cambio de los residuos Lys375 e His481 no alteran la k_{cat} ni la reactividad con PMSF, por lo que no deben ser residuos importantes en la catálisis (Prieto y col., 1990).

Varios autores han propuesto que uno o más residuos de triptófano podrían estar implicados en el centro activo de la PGA (Robak y Szewczuk, 1981; Mahajan y Borkar, 1983). Sin embargo, sus estudios no fueron muy completos al no calcular los parámetros cinéticos ni cuantificar el número de residuos de triptófano modificados. Posteriormente, Márquez y col. (1988) estudiaron la interacción de la PGA con penicilina G sulfóxido, observando cambios conformacionales que afectaban al microentorno de varias tirosinas

y triptófanos de ambas subunidades. También se ha propuesto la existencia de un residuo de arginina cerca del centro activo de la PGA de *E.coli* (Prabhune y Raman, 1990).

Otro dato importante relativo a residuos implicados en la catálisis, sería la participación de dos histidinas en el centro activo de la AMA de *P. melanogenum* (Kim y Byum, 1990).

A la luz de los recientes datos cristalográficos muchas de estas interpretaciones han quedado sin sentido ya que parece que la catálisis se lleva a cabo mediante un mecanismo atípico, con la única participación de la serina N-terminal de la subunidad β (Duggleby y col. 1995). Los residuos que se encuentran en el bolsillo catalítico son la Met168 y la Phe172 de la subunidad α y la Ser67, la Ile177, la Phe57, el Trp154 y la Arg263 de la subunidad β . En la boca de este bolsillo se encuentran, entre otros, la serina catalítica, la Asn 241, la Gln23 y la Ala 69, todos ellos en la subunidad β . Las estructuras de los complejos PGA:ácido fenilacético y PGA:PMSF han permitido determinar el sitio de unión de la cadena lateral de los sustratos (figura 5). El resto fenilo de cada uno de estos inhibidores se localiza en el interior de la proteína en un bolsillo hidrofóbico que está constituido por varias cadenas laterales aromáticas e hidrofóbicas (Duggleby y col. 1995).

7.3. MECANISMO CINETICO.

7.3.1. Dependencia de los parámetros cinéticos con el pH.

Se ha estudiado la variación de los parámetros cinéticos de la PGA de *K. citrophila* con el pH, para obtener información acerca del mecanismo químico de la reacción catalizada por la enzima. El resultado de estudiar la dependencia con el pH de la constante de especificidad (V/K_m) para la hidrólisis de penicilina G indicó que la forma libre de la enzima catalíticamente activa presenta un grupo con un pK en torno a 4,7 que debe estar desprotonado, y otro grupo con un pK cercano a 9,7 que debe estar protonado. Los estudios de perturbación con disolventes orgánicos y el efecto de la temperatura mostraron que estos grupos eran de tipo ácido catiónico y de tipo ácido neutro, respectivamente, con entalpías de ionización de 29,7 kJ/mol y 111 kJ/mol. Tras estudiar la naturaleza de la inhibición de la penicilina G sulfóxido, con respecto a la hidrólisis de la penicilina G, se vió que era competitiva y reversible. La similitud encontrada con el caso anterior del perfil de pH, y valores de pK obtenidos a partir de la constante de inhibición (K_i), permitió proponer que los grupos ionizables esenciales participan en la unión de la molécula de penicilina G y sus análogos en el centro activo de la enzima gracias al establecimiento de puentes de hidrógeno (Martín y col., 1993a).

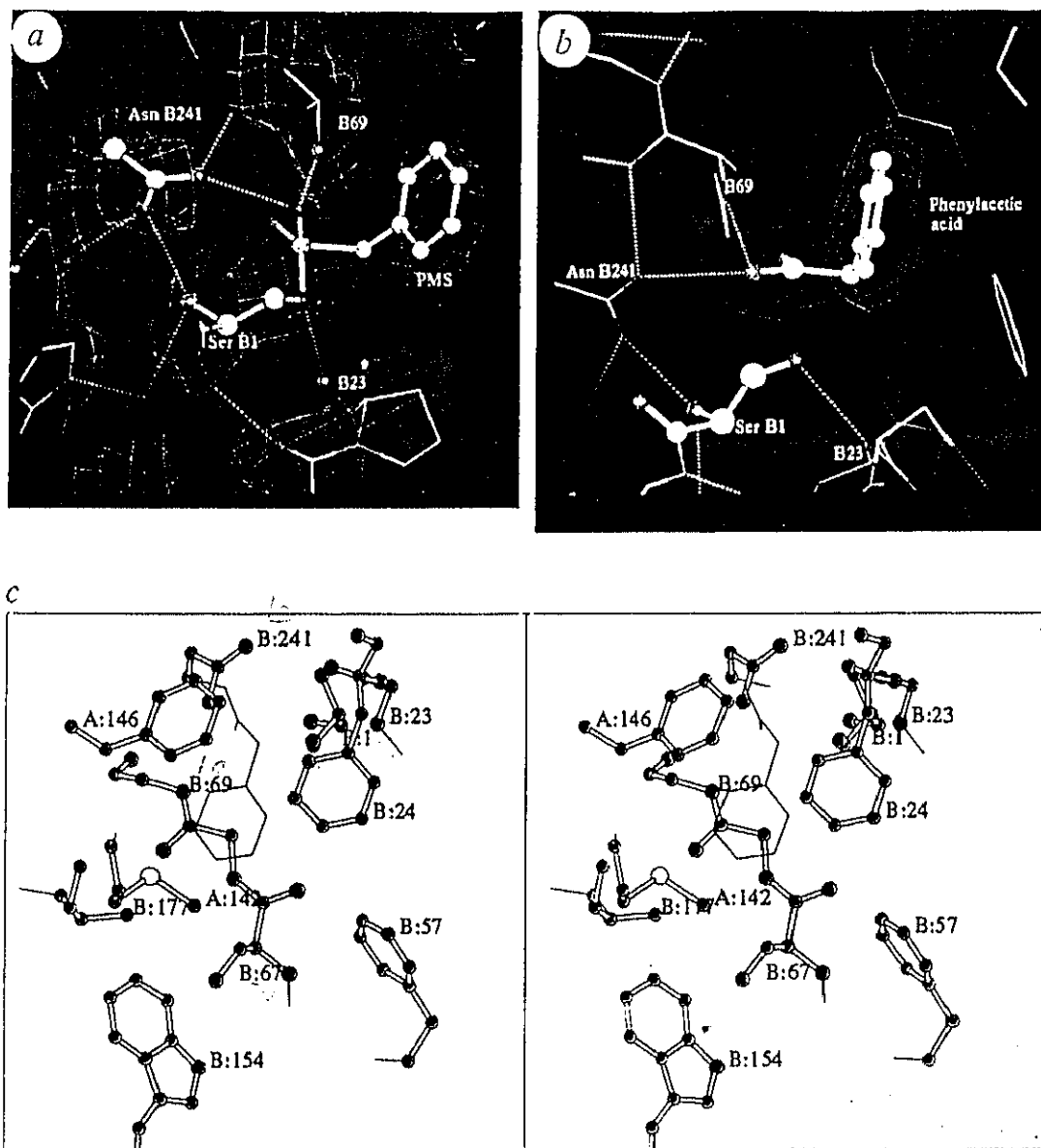
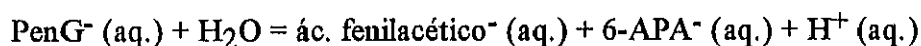


Figura 5. Estructura del centro activo de la PGA en presencia de PMSF y FA. a. Complejo PGA:PMSF. Se puede observar la estructura del intermedio tetraédrico. Se muestran las interacciones que se establecen entre las cadenas laterales de los residuos GlnB23, AlaB69 y AsnB241 y el inhibidor. Las líneas de puntos representan posibles puentes de hidrógeno. **b.** Complejo PGA:FA (cadena lateral de la penicilina G sulfóxido). Se observa cómo la posición de la SerB1 es adecuada para llevar a cabo el ataque nucleofílico al carbono carbonílico. **c.** Representación estereoscópica del ácido fenilacético situado en el bolsillo catalítico. La numeración de los residuos indica su posición en las subunidades α y β maduras (Duggleby y col. 1995).

La inactivación de la PGA de *K. citrophila* por N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína, un reactivo específico de grupos carboxilo, se vio que respondía a un mecanismo de modificación enzimática en equilibrio termodinámico. El análisis cinético y termodinámico de este proceso llevó a sus autores a concluir que la inactivación transcurría a través de una reacción en dos pasos, en donde una rápida unión reversible inicial era seguida de un paso inactivante y lento, también reversible (Martín y col., 1993b).

7.3.2. Perfil termodinámico de la catálisis.

La constante de equilibrio de la hidrólisis de la penicilina G por la PGA de *E. coli*, en ácido fenilacético y 6-APA, es dependiente del pH, favoreciéndose la reacción directa a pH alcalino (Svedas y col., 1980; Konecny y col., 1983). Las medidas más precisas sobre el equilibrio termodinámico se han determinado mediante estudios de HPLC y microcalorimetría (Tewari y Goldberg, 1988) y muestran los siguientes parámetros termodinámicos para la reacción:



$$K = (7,35 \pm 1,5) \times 10^{-8} \text{ mol kg}^{-1}$$

$$\Delta G^\circ = 40,7 \pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta H^\circ = 29,7 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\Delta C_p^\circ = -240 \pm 50 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} (\text{a } 298,15\text{K})$$

También se han calculado las constantes de equilibrio en la hidrólisis de otros sustratos, por ejemplo para la ampicilina (Margolin y col., 1978), pero se han realizado de forma menos precisa.

Los perfiles termodinámicos de la reacción de hidrólisis de penicilina G catalizada por las PGA de *K. citrophila* nativa y el mutante Met168Ala, calculados a partir de la dependencia de los parámetros cinéticos con la temperatura, indican que la unión del sustrato requiere unas elevadas entalpía y entropía de activación. Esto sugiere la existencia de un mecanismo de ajuste inducido (Martín y col., 1990).

7.3.3. Cinéticas en estado estacionario.

La elucidación del mecanismo cinético de la hidrólisis de penicilinas por las PA se ha realizado mediante el empleo de dos estrategias generales: caracterización de la inhibición causada por los productos de la reacción y estudio cinético de la competencia

entre sustratos alternativos, tanto en la reacción de hidrólisis como en la síntesis de penicilinas.

En la reacción de hidrólisis de penicilina G catalizada por la PGA de *E.coli* (Balashingham y col., 1972; Kutzbach y Rauenbusch, 1974) o por la PGA de *B.megaterium* (Chiang y Bennet, 1967), ambos productos de la reacción, 6-APA y ácido fenilacético, se comportan como inhibidores no competitivo y competitivo, respectivamente. Este resultado indica que el mecanismo cinético de catálisis es de tipo ordenado Uni Bi, en el que el primer producto de salida es 6-APA (Roberts, 1977). Una diferencia entre las dos enzimas anteriores es que sólo la PGA de *E. coli* es inhibida por un exceso de sustrato. Se han encontrado algunas excepciones a este comportamiento en otras PA. Así, la PVA de *B. plumbea* no es inhibida ni por el sustrato ni por ninguno de los productos de la reacción, 6-APA y ácido fenoxiacético (Schneider y Roehr, 1976). La PVA de *B. sphaericus* es inhibida competitivamente por 6-APA y no competitivamente por ácido fenoxiacético (Mahajan, 1984). Sin embargo, tras la comparación realizada entre las diferentes ecuaciones de velocidad obtenidas para las cinéticas de reacción que incluyen las inhibiciones por sustrato y por producto (Lee y Ryu, 1982; Nam y col., 1985), se podría concluir que todas las PA responden a un mismo mecanismo global.

Las mejores condiciones experimentales para analizar la hidrólisis de la penicilina G por la PGA de *E. coli*, se han obtenido en un intervalo de pH entre 7 y 8,5. Los valores de K_m calculados por diferentes autores varían entre 2×10^{-5} M (Kutzbach y Rauenbuch, 1974) y $8,5 \times 10^{-6}$ M (Veronese y col., 1981). En estos mismos estudios la K_i del ácido fenilacético osciló de $2,8 \times 10^{-5}$ M a 2×10^{-4} M. La inhibición por 6-APA es mucho más débil con un valor de $K_i \sim 10^{-2}$ M.

De entre los muchos sustratos de la PGA, la penicilina G presenta el valor de constante de especificidad más alto, $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Margolin y col., 1980). La mayoría de los sustratos amidas que llevan como resto acilo al ácido fenilacético muestran valores de k_{cat} similares, cercanos a 50 s^{-1} , mientras que para los ésteres este valor es unas tres veces mayor. Esto implica que la hidrólisis de ambos sustratos difiere en la etapa limitante del proceso, siendo el paso de acilación limitante en la hidrólisis de las amidas y el paso de desacilación limitante para los ésteres.

El hecho de que la PGA pueda catalizar la transferencia de grupos acilo se explica por la formación de un intermedio acil-enzima (Konecny, 1981). La transferencia de acilo catalizada por las PA es un proceso controlado cinéticamente. La existencia de tales mecanismos enzimáticos de transferencia de acilo ha sido observada también en el caso de la síntesis peptídica por esterasas y proteasas (Goldberg y Fruton, 1969; Morihara y Oka, 1977). El principio básico que justifica este comportamiento es la competencia entre el agua (reacciones de hidrólisis) y el resto de nucleófilos (reacciones

de síntesis) por el intermedio común (acil-enzima) que contiene el resto acilo activado que va a ser transferido (Konecny, 1981; Konecny y col., 1981, 1983)

Sin embargo, será necesario realizar el estudio cinético en estado pre-estacionario para caracterizar con precisión el mecanismo de catálisis de las PA.

7.3.4. Cinéticas en estado pre-estacionario.

Los estudios cinéticos en el estado estacionario dan una información muy limitada acerca del mecanismo enzimático. Esto se debe a que la realización de estos estudios requiere una baja concentración de enzima, ya que el estado estacionario se define porque la concentración de los intermedios de la reacción no varían con el tiempo, y por tanto, sólo permiten determinar la velocidad total del proceso. Por supuesto, esta información es útil para estudiar una enzima, pero si aumentamos la concentración de ésta se podrían detectar los intermedios enzimáticos y obtener mayor información cinética. Como la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente es dependiente de la concentración de ésta, el incremento de la concentración de enzima acelerará la reacción de tal manera que será necesario recurrir a una tecnología especialmente diseñada para poder estudiar este tipo de cinéticas rápidas.

Una simple consideración será suficiente para ilustrar la importancia de las técnicas de cinéticas rápidas. Aunque el número de recambio (o "turnover") entre diferentes enzimas es muy variable, la mayoría presenta un valor aproximado de unos 100 s^{-1} . A esta velocidad el paso más lento de una reacción sería de unos 7 ms, y esto hace necesario observar la formación y descomposición de un intermedio en la escala de milisegundos. Las técnicas de mezcla clásicas necesitan un tiempo mínimo alrededor de 10 segundos y esto las limita en el estudio de las reacciones enzimáticas en estado pre-estacionario. Sin embargo, el diseño de los métodos de mezcla y detección rápidos, como es la técnica de flujo detenido, ha permitido solventar el problema.

El método de flujo detenido fue desarrollado por Roughton (1934) y perfeccionado por Chance seis años después (1940). El principio de esta técnica podría resumirse en pocas palabras como un equipo que consta de dos jeringas, que son disparadas automáticamente para iniciar la reacción que comienza en la cámara de mezcla. El progreso de la reacción se sigue a través de un detector adecuado.

8. APLICACIONES INDUSTRIALES.

Las BLA representan el único grupo de enzimas que ha sido empleado en la industria inmediatamente después de su descubrimiento, hace ya más de dos décadas.

Esto ha sido posible gracias al avance simultáneo en diferentes aspectos de la biotecnología, tales como la mejora de cepas productoras, fermentación automática, purificación enzimática a gran escala, inmovilización enzimática, diseño de reactores, etc.

Aunque la principal aplicación industrial de las β -lactam acilasas consiste en obtener los núcleos de las penicilinas y cefalosporinas semisintéticas (6-APA, 7-ADCA y 7-ACA), la baja especificidad de sustrato de esta familia de enzimas, su estereoespecificidad y su capacidad de catalizar reacciones de acilación, permiten ampliar el margen de sus utilidades industriales.

8.1. INMOVILIZACION ENZIMATICA.

Los intereses comerciales que mueven el desarrollo de la tecnología para obtener los intermedios de la síntesis de las penicilinas y cefalosporinas semisintéticas, han conducido a considerar diferentes métodos de uso de las BLA. (Queener y Swartz, 1979; Abbot, 1976; Vandamme, 1980). Así se han empleado:

- 1 - Sistemas de células libres.
- 2 - Preparaciones enzimáticas solubles obtenidas por extracción de la enzima de las células productoras, o concentrando aquellas de naturaleza extracelular.
- 3 - Inmovilización de células.
- 4 - Inmovilización de la enzima.

Factores tales como mejorar la vida media del catalizador, los beneficios económicos que reporta su reutilización y la exclusión de macromoléculas alergénicas del producto, hacen que la inmovilización de la enzima sea la opción elegida a nivel industrial. La inmovilización de la enzima, resulta a su vez, ventajosa frente a la inmovilización de células, por su mayor actividad y especificidad, menores limitaciones de difusión de sustrato y productos, y un mejor control de esterilidad. Sin embargo, la mejora en el diseño de biocatalizadores que inmovilizan células enteras, se ha seguido intentando, dado el abaratamiento de la producción que supondría poder evitar la etapa de purificación (Rodríguez, y col., 1994). La inmovilización de la PA ha sido uno de los principales factores que han contribuido a que la obtención enzimática de 6-APA sea un proceso económicamente viable, representando uno de los pocos éxitos a gran escala en la tecnología de inmovilización de enzimas.

Se han empleado una gran variedad de matrices para inmovilizar la PA. Los métodos físicos y químicos que se utilizan para la inmovilización son: adsorción, atrapamiento en fibras, microcapsulación, intercambio iónico, entrecruzamiento, copolimerización y unión covalente (Lagerlof y col., 1976; Savidge y Vandamme, 1984; Vandamme, 1981). Los protocolos iniciales de inmovilización enzimática han sufrido sólo ligeras variaciones, sin embargo, se han descrito otras dos aproximaciones para

poder reutilizar la PA. La primera consiste en un sistema acuoso en dos fases, constituido por dos polímeros solubles un agua, o bien, por un polímero soluble en agua y una solución salina. La enzima se enriquece en una de las dos fases. Este tipo de sistemas presenta muy baja tensión superficial entre las fases, y con una pequeña agitación hay una buena transferencia de masa, evitando las limitaciones de difusión por disponer de una gran área de superficie de intercambio. La concentración de enzima puede optimizarse, sin tener en cuenta las dimensiones del reactor y el volumen de matriz, además, se puede añadir enzima durante el proceso si es necesario, lo cual supone una ventaja sobre el método de inmovilización enzimática (Anderson y col., 1984). La segunda incorpora la PA en un complejo polielectrolítico soluble, pero precipitable. Estos polímeros se forman por una rápida reacción de intercambio iónico entre polímeros de carga opuesta. La enzima se une covalentemente a los polímeros, y el complejo enzima-polímero se precipita acidificando el medio. Este complejo, es de nuevo solubilizado aumentando el pH (Margolin y col., 1982). En la tabla 7 se muestran algunos ejemplos de acilasas inmovilizadas.

La eficiencia y propiedades de la inmovilización de enzimas depende de la fuente enzimática, su pureza, la naturaleza del soporte, y el método de inmovilización. Las propiedades físico-químicas de la enzima pueden alterarse como consecuencia de la inmovilización. La limitación difusional y la fuerte unión de la enzima en un alto número de puntos, puede influir sobre el valor de K_M . El perfil de actividad frente al pH se puede alterar con la unión a un soporte cargado. La termoestabilidad de la enzima generalmente aumenta en respuesta a su reducida flexibilidad cuando está inmovilizada. La oclusión de centros alostéricos o la repulsión debida a grupos cargados en el soporte altera las constantes de inhibición. En general, los efectos sobre la K_M y la K_I son mayores que los cambios en pH y temperatura óptima.

8.2. PRODUCCION DE 6-APA.

El 6-APA es el principal compuesto en la producción de las penicilinas semisintéticas, algunas como ampicilina o amoxicilina de elevado uso terapéutico. Se calcula en unas 6000 toneladas su producción anual, estimándose que para el año 2000 alcance las 7000 toneladas.

En un principio, el 6-APA se obtenía por desacilación química de la penicilina G o V, pero los productos empleados en el proceso, tales como piridina, pentacloruro de fósforo y cloruro de nitrosilo, además de peligrosos, suponían un problema de extracción después de la reacción. Por tanto, la introducción de la desacilación enzimática usando la PA, vino a solventar estos problemas, convirtiéndolo en algo sencillo y seguro.

Tabla 7. Matrices empleadas para inmovilizar β -lactam acilasas.

FUENTE	SOPORTE	REFERENCIA
<i>B. megaterium</i>	Aducto intermolecular con glutaraldehído	Cross, 1985
	Bentonita	Squibb, 1969
<i>E. coli</i>	Sepharose; Sephadex G-200	Delin, 1973
	Acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida y anhídrido maleico	Huper, 1973
	Dextrano	Huper, 1973
	Tetrametilenglicol; Dimetacrilato; Acido metacrílico	Bayer, 1975
	DEAE-Celulosa; CM-Celulosa; AE-Celulosa; CM-Sephadex	Beecham, 1971
	Amberlite IRC-50	Beecham, 1975a
	Copolímeros de anhídrido etilen maleico	Beecham, 1975
	Nylon	Beecham, 1976
	Amberlita XAD-7	Beecham, 1975b
	Sucrosa/ epiclorohidrina copolímero	Beecham, 1974
	Poliacrilamida	Boehringer M., 1985
	Celulosa	SivaRaman, 1976a
	Eupergit C	Kreamer, 1982
	Fibras de celulosa triacetatoAH-Sepharosa/benzoquinona	Marconi, 1973
	Fibras de nitrocelulosa	SNAM Proghetti, 1976
	Poliétilen imina	SNAM Proghetti 1981
<i>B. circulans</i>	DEAE-Sephadex	Otsuka Seiyaku C., 1972
<i>P. rettgeri</i>	Glicidil metacrilato; Metilen bisacrilamida	Pfizer, 1975
	Tierra de diatomeas; Poli (hidroxietil-metacrilato)	Pfizer, 1975
<i>Fusarium spp</i>	Aducto intermolecular con glutaraldehído	SivaRaman, 1976b
<i>P. GK-16</i>	Resinas de intercambio iónico con glutaraldehído	Asahi, 1987

Aunque ya se ha comentado la diversidad de organismos productores de PA, en la industria dos son las cepas que se utilizan prioritariamente: *E. coli* y *B. megaterium*. Estas enzimas se inmovilizan en biorreactores, cuyo diseño evoluciona continuamente para optimizar la reacción. Básicamente, se establecen las condiciones de reacción como resultado de un compromiso entre la estabilidad del sustrato (penicilina G o V), del producto (6-APA) y de la PA inmovilizada. Así, el proceso de hidrólisis suele transcurrir entre 35-37 °C y a pH 7,8-8,0. Durante la hidrólisis, se libera ácido fenilacético o fenoxiacético, según el sustrato sea penicilina G o V, respectivamente, lo cual disminuye el pH, y por tanto, se hace necesario un controlador de pH. El pH se estabiliza por adición de álcali que debe ser distribuido uniformemente en el bioreactor de un modo rápido, para evitar la inactivación enzimática que ocasionaría una acumulación puntual (Savidge, 1984). La cristalización del 6-APA es la última parte del proceso. Una vez separado del resto de la mezcla de reacción, se consigue 6-APA de gran pureza por precipitación en su punto isoelectrico. El rendimiento en la producción del 6-APA oscila alrededor del 90%, y la eficiencia de la cristalización es de un 94% (Shewale y Sivaraman, 1989).

8.3. PRODUCCION DE 7-ADCA.

El 7-ADCA es un compuesto importante en la producción de las cefalosporinas semisintéticas, tales como la cefalexina, el cefradine y el cefradoxil. Se estima que unas 500 toneladas de este compuesto son comercializadas al año. Inicialmente, el 7-ADCA se producía mediante la desacilación química del fenilacetil 7-ADCA obtenido por expansión del anillo de penicilina G. Hoy en día, este proceso se realiza por desacilación enzimática empleando PA inmovilizada de forma similar a como se hace para la producción de 6-APA. El rendimiento final del proceso se encuentra en torno al 85% (Shewale y col. 1990).

8.4. PRODUCCION DE 7-ACA.

El 7-ACA es un intermedio en la semisíntesis de cefalosporinas, algunas con tanta repercusión comercial como la cefaloglicina y la cefalotina, produciéndose anualmente unas 1000 toneladas. Se origina a partir de cefalosporina C. El proceso de desacilación química por el método del iminoeter es sumamente complejo, y utiliza productos altamente tóxicos y contaminantes, principalmente derivados fosforados, requiriéndose además un sustrato muy puro. A pesar de la dificultad que representa el hecho de que ninguna enzima es capaz de hidrolizar el enlace amida cuando el resto acilo es α -aminoalifático, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar un proceso de

desacilación enzimática. Actualmente, el proceso de obtención de 7-ACA se lleva a cabo en dos etapas. En primer lugar se lleva a cabo una desaminación oxidativa de la cefalosporina C a glutaril 7-ACA. Este proceso puede ser catalizado química o enzimáticamente. La desaminación química se realiza con α -ceto-derivados, como el ácido glioxílico, en presencia de sulfato cúprico y piridina (Asahi, 1987). Así, se transforma la cefalosporina C en ceto-cefalosporina C, muy inestable, y que por descarboxilación genera glutaril 7-ACA, más estable. La desaminación oxidativa puede catalizarse enzimáticamente con D-aminoácido oxidasa de *Trigonopsis variabilis* o de *Fusarium solani* (Glaxo, 1975; Toyo, 1976) o de *Rhodotorula gracilis* (Curti y col., 1992)

La desacilación del glutaril-7-ACA a 7-ACA se cataliza enzimáticamente mediante una GLA. Aunque hay varias fuentes de GLA (tabla 3), la más utilizada industrialmente es la GLA de la cepa de *Pseudomonas* GK-16, obtenida por mutación de la cepa SY-77-1 (Ichikawa, 1981). El gen de esta acilasa se ha subclonado en un plásmido multicopia (Matsuda y Komatsu, 1985). La GLA inmovilizada, análogamente a las PA, se dispone en un biorreactor donde se aplica el glutaril-7-ACA, tras ser parcialmente purificado en una resina de adsorción. También es necesario controlar la acidificación del medio, pues durante el proceso se libera ácido glutárico.

Aunque se ha descrito que la GLA producida por *Pseudomonas* sp. SE83 es capaz de transformar la cefalosporina C en 7-ACA, el proceso es muy ineficiente, y aún no ha sido utilizado industrialmente.

Una nueva e interesante aproximación en la producción de 7-ACA, resulta de la construcción de un operón biosintético con los genes que codifican una D-aminoácido oxidasa de *Fusarium solani*, y una GLA de *P. diminuta*. Estos genes se pusieron bajo el control de los elementos reguladores del gen de la proteasa alcalina de *A. chrysogenum*, cepa productora de cefalosporina C. Desafortunadamente, la presencia de una catalasa endógena que produce *Acremonium*, limita la conversión de cefalosporina C a 7-ACA, por eliminar el H_2O_2 presente. Sin embargo, aunque la cantidad de 7-ACA producida no sea significativa a nivel industrial, la posibilidad de manejar microorganismos industriales con nuevas capacidades biosintéticas, resulta un paso adelante dentro de la ingeniería de microorganismos y su explotación industrial (Isogai, 1991).

Aunque 6-APA, 7-ADCA y 7-ACA son los principales intermedios de la síntesis de antibióticos β -lactámicos, las BLA pueden generar otros intermedios, como por ejemplo: 6-amino-2,2-dimetil-3-(tetrazol-5-il) penam (Hamsher, 1975), metil-6-aminopenicilato (El-Din y Attia, 1973), ácido 3-metil-7 β -amino-3-cefem-4-carboxílico (Fleming, 1974), y ácido 3-amino nocardínico (Komori, 1978).

8.5. REACCIONES DE TRANSACILACION.

Las reacciones catalizadas por las BLA son reversibles. La reacción de hidrólisis está favorecida a pH alcalino (7,5-8,5), mientras que a pH ácido o neutro (4,0-7,0) se favorece la reacción de acilación (Claridge, 1960; Kaufmann, 1960; Rolinson, 1960). La capacidad de las BLA de catalizar reacciones de transacilación permite sintetizar antibióticos β -lactámicos, compuestos fisiológicamente activos y sus intermedios (Cole, 1969d; Abbott, 1976; Queener y Swart, 1979; Vandamme, 1983; Savidge, 1984; Sudhakaran y Borkar, 1985; Kasche, 1986).

Las PA catalizan la transacilación desde el grupo alcoxi de los ésteres, o desde el grupo carboxilo de los ácidos de diferentes estructuras, al grupo amino de moléculas peptídicas cíclicas o lineales. La acilación enzimática tiene la ventaja sobre la acilación química de no necesitar como prerequisite la protección del grupo funcional, pues se desarrolla en unas condiciones de reacción muy suaves. Para conseguir un proceso más viable económicamente, se han estudiado diferentes aproximaciones en cuanto a la naturaleza de los grupos donadores o de los solventes utilizados (Kasche, 1986; McDugall, 1982; Nam, 1984; Muneyuki, 1981; Luethi, 1987; Pessina, 1988).

8.6. SINTESIS DE ANTIBIOTICOS.

El empleo de enzimas a nivel industrial como catalizadores de reacciones de condensación, resulta muy ventajoso frente a la condensación no enzimática. Reduce los costes de producción y procesamiento, minimiza el uso de disolventes problemáticos e intermedios no deseados, y facilita un reciclamiento máximo. Además, no requiere elevadas temperaturas y presiones. Por tanto, se han estudiado ampliamente los mecanismos enzimáticos del proceso, y se ha realizado un análisis racional de la influencia de diversos factores (temperatura, pH, fuerza iónica, etc.) para optimizar las condiciones del proceso (Vandamme, 1983; Chaiken y col., 1982).

Las BLA pueden ser utilizadas para catalizar la condensación de productos, y por tanto, sintetizar antibióticos β -lactámicos. En los procesos biotecnológicos, para conseguir una producción máxima, la síntesis puede realizarse mediante reacciones controladas en el equilibrio o bien, cinéticamente controladas. En estas últimas el rendimiento viene influenciado por las propiedades de la enzima que actúa en este caso como una transferasa. En este tipo de síntesis, a diferencia de las reacciones controladas en el equilibrio, para una misma cantidad de enzima, la producción es máxima y el proceso es mucho más rápido. En las reacciones controladas en el equilibrio es necesario reducir al máximo la cantidad de agua presente en el medio, por lo que se tienen que incluir en la reacción disolventes orgánicos, en cuyo caso, las enzimas deben

inmovilizarse para favorecer su estabilidad y protección. En las reacciones cinéticamente controladas se requiere un sustrato activado como donador de acilos (un éster) que es en gran parte hidrolizado por la acilasa. Esto encarece la producción, pues hace necesario el uso de grandes cantidades de sustrato (Kasche, 1986). Sin embargo, el sustrato puede reciclarse aumentando la producción (Kasche, 1982 y 1988).

Utilizando las acilasas se han sintetizado antibióticos a partir de 6-APA (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, feneticilina, pivampicilina, carbenicilina, oxacilina, dicloxacilina), 7-ADCA (cefalexina, cefadroxil, cefradine), y 7-ACA (cefalotina, cefaloglicina, cefamandol). Otros antibióticos como las monobactamas o la fenilacetil tienamicina también se han sintetizado por vía enzimática (Shewale y col., 1990).

8.7. REACCIONES DE PROTECCION-DESPROTECCION SELECTIVA.

En la síntesis de péptidos es necesario proteger algunos grupos activos para que los acoplamientos se lleven a cabo de forma precisa. La selección de los grupos protectores viene determinada por las condiciones de protección y desprotección, que no deben afectar al péptido. Las aproximaciones tradicionales presentan una serie de limitaciones debido a que las condiciones de reacción resultan relativamente fuertes (pH extremos, solventes orgánicos, altas temperaturas), que pueden dañar los péptidos durante el proceso de protección. El uso del ácido fenilacético en lugar del fórmico, que habitualmente se emplea para la protección de péptidos, presenta la ventaja de que la desprotección puede llevarse a cabo mediante el empleo de las PA en condiciones muy suaves. Otra ventaja resultante de emplear PA es la especificidad de la hidrólisis del enlace fenilacetamido que preserva la hidrólisis de los enlaces peptídicos así como los enlaces ésteres que protegen al carboxilo. Las PA catalizan la hidrólisis de un amplio espectro de péptidos fenilacetilados, sin embargo, la velocidad de la hidrólisis viene determinada por la naturaleza de los aminoácidos, su configuración, y la solubilidad del péptido (Fuganti y col., 1986; Waldmann, 1988a y b).

Otros interesantes procesos biotecnológicos donde se ha demostrado la utilidad de las PA son las reacciones de protección-desprotección selectiva en la química de carbohidratos (Waldmann, 1988a), insulina, vasopresina (Wang y col., 1986) y aspartama (Fuganti y Grasselli, 1986).

8.8. RESOLUCION DE DIASTEREOISOMEROS.

La resolución de aminoácidos mediante el empleo de BLA se basa en la estereoespecificidad que presentan estas enzimas por los L-aminoácidos (Cole, 1964). Los fenilacetil-DL-aminoácidos se tratan con PGA que libera el L-aminoácido.

Posteriormente, el aminoácido libre se separa de la amida mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante extracción con solventes. Finalmente, el D-aminoácido se obtiene por desacilación química. De esta manera, se ha preparado la D-fenilglicina necesaria para la síntesis de la ampicilina o la cefalexina, y otros compuestos de interés industrial (Shewale y col., 1990).

Aprovechando la propiedad que tienen las acilasas de actuar como esterasas, la PGA se ha utilizado para la hidrólisis enantioselectiva de ésteres de carbinos primarios con fenilacético. Los productos derivados de la desesterificación enzimática se han utilizado para la síntesis de monosacáridos, feromonas, alcaloides, macrólidos y antibióticos ionóforos (Fuganti y col., 1988; Waldmann, 1989; Shewale y col., 1990).

8.9. OTRAS APLICACIONES.

La producción de 6-APA y 7-ACA mediante el empleo de PGA inmovilizada justifica plenamente que la aplicación de las BLA a nivel industrial pueda considerarse uno de los mayores éxitos biotecnológicos. Sin embargo, esta familia de enzimas posee una clara vocación industrial y es muy probable que en un futuro inmediato puedan desarrollarse otros procesos. En este sentido, la metodología para la producción enzimática de 7-ACA con GLA está avanzando a grandes pasos y muy pronto este proceso sustituirá a la desacilación química.

La síntesis de antibióticos β -lactámicos utilizando la acilación enzimática no es un proceso que pueda competir con la síntesis química, pero los rendimientos se aproximan en algunos casos al 85%. La preparación de enzimas inmovilizadas más estables frente a los solventes orgánicos, o la obtención de acilasas que presenten constantes cinéticas más adecuadas para llevar a cabo la síntesis mediante procesos controlados cinéticamente, pueden llegar a hacer rentables el proceso enzimático, más aún si se tiene en cuenta el alto poder contaminante del método químico.

La ingeniería de proteínas puede contribuir mucho en esta tarea, ya que una vez que se determine la estructura tridimensional de la PGA será posible actuar sobre los parámetros catalíticos de forma racional. Por el momento, la aproximación basada en el uso de distintos métodos de mutagénesis-selección ya ha puesto de manifiesto que la PGA y la GLA son enzimas moldeables y que es posible cambiar su especificidad de sustrato (Daumy y col., 1985a y b; Forney y Wong, 1989; Forney y col., 1989).

9. PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS β -LACTAM ACILASAS.

El uso de PA en la producción industrial de 6-APA y el gran interés de éste, han orientado la investigación preferentemente a las mejoras de la producción y catálisis en perjuicio de la atención prestada a su papel fisiológico en los microorganismos productores. Dependiendo de la procedencia de las PA estudiadas, se han propuesto muy diferentes funciones para éstas, que van desde la de conferir resistencia frente a la actividad antibiótica de las penicilinas, a la de tratarse de una actividad enzimática accidental de alguna proteína estructural. La idea más generalizada es que la formación de 6-APA a partir de penicilina parece tratarse más bien de una reacción colateral de esta acilasa cuyo verdadero significado fisiológico es aún desconocido. De hecho, constituye un raro ejemplo de una actividad catalítica atípica que es explotada industrialmente sin conocerse su función natural. Vandamme y Voets (1974) han realizado una extensa revisión de este tema en la que se recogen referencias bibliográficas de las numerosas, variadas, y a veces contradictorias hipótesis propuestas.

Quizás sea a partir del estudio de la regulación génica como se ha podido abordar este problema de un modo más riguroso. La capacidad de las PA de hidrolizar otros compuestos derivados de fenilacético además de las penicilinas, junto al hecho de que su mecanismo de regulación presenta inducción por fenilacético o fenoxiacético, así como represión catabólica por metabolito, han llevado a Valle y col. (1991) a sugerir un papel de las PAs en la asimilación de compuestos aromáticos como fuentes de carbono.

E. coli es capaz de crecer sobre compuestos aromáticos, lo que no debería sorprendernos dado el elevado número de derivados aromáticos que resultan del metabolismo de los compuestos presentes en su hábitat intestinal/fecal. Al estudiar la regulación del gen *pac*, que codifica para la PA se han encontrado características comunes con los genes implicados en la asimilación de compuestos carbonados. Es importante mencionar que están descritas en *E. coli* la degradación metabólica del ácido fenilacético y de otros compuestos aromáticos muy relacionados: ácido 3- y 4-hidroxifenilacético y ácido fenilpropiónico (Burlingame y Chapman, 1983; Cooper y Skinner, 1980; Cooper y col., 1985; Prieto, 1993; 1994). Estas evidencias sugieren que las PA serían amidasas implicadas en la degradación de compuestos fenilacetilados a ácido fenilacético, que podría utilizarse como fuente de carbono, y servir como inductor de la vía degradativa. Esta vía sería útil para *E. coli* sólo cuando se encuentre en determinados medios donde se vea obligado a utilizar fuentes de carbono alternativas a las que utiliza cuando está como parásito. Los derivados de ácido fenilacético son muy abundantes, y se originan por la acción de la microflora sobre diferentes componentes vegetales. Estos incluyen los ácidos fenólico y cafeico, los flavonoides catequina,

pirecetina y hesperetina, y los aminoácidos fenilalanina y tirosina, así como alguno de sus metabolitos (Burlingame, 1983).

La termorregulación juega un papel importante en el control de la expresión génica de las PA. Este hecho viene también a apoyar la hipótesis de que las PA están implicadas en la degradación de compuestos fenilacetilados. Las temperaturas bajas podrían actuar como una señal indicadora de un hábitat nuevo (Nakare, 1986), y así, junto con la presencia de derivados fenilacetilados se induciría la síntesis de las PA. Por tanto, la producción de PA puede considerarse como una ventaja adaptativa. A la luz de esta hipótesis, la PA no sería un enzima esencial para el crecimiento de *E.coli* como parásito, ya que a 37°C su actividad enzimática es despreciable (Valle, 1991).

El papel catabólico propuesto para la PA en *E. coli* podría ser similar en otros organismos, aunque la vía metabólica empleada para asimilar el ácido fenilacético fuera diferente. Por ejemplo, en *P. rettgeri* ATCC 31052, la PA no se induce con ácido fenilacético y no presenta represión catabólica por glucosa, sin embargo, se reprime por algunos intermedios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Daumy y col., 1982).

En cuanto a las GLA y las CCA se ha sugerido que pueden ser PA modificadas que han divergido de un precursor ancestral común. Su papel dentro del aprovechamiento de compuestos aromáticos está por discutir.

OBJETIVOS

Las β -lactam acilasas constituyen una familia de enzimas de gran importancia industrial. Obviamente, para llevar a cabo procesos de ingeniería de estas proteínas, se hace obligatorio caracterizar en detalle su relación estructura-función. Los estudios que se han desarrollado para elucidar los diferentes aspectos moleculares de la PGA de *K.citrophila*, como miembro representativo de esta superfamilia, podrían ayudar a comprender el funcionamiento del resto de los miembros de la familia BLA.

Los objetivos del trabajo desarrollado se pueden resumir en los siguientes apartados:

i).- Modificación de la especificidad de sustrato.

Se pretende en primer lugar, ampliar el espectro de acción de la PGA, para poder emplearla tanto en la hidrólisis como en la síntesis de nuevos antibióticos β -lactámicos u otros compuestos de interés. Además se trata de identificar aquellos residuos implicados en la unión del sustrato.

ii).- Mecanismo cinético.

La elucidación de las bases moleculares de la actividad catalítica de la enzima permitirá establecer el mecanismo cinético de la reacción. Se intentará desarrollar un ensayo que permita realizar el estudio cinético en el estado pre-estacionario. Este estudio resulta fundamental para detectar la presencia de intermedios enzimáticos, así como para su caracterización. Una vez determinado el mecanismo se podrían establecer las bases de una catálisis más eficiente.

iii).- Análisis de la regulación y de la expresión génica.

Se procederá a determinar los mecanismos moleculares implicados en los diferentes niveles de la regulación y en la expresión génica. El conocimiento de los factores que controlan la expresión génica, por ejemplo inductores, catabolitos o temperatura, permitirá modular los niveles de expresión.

MATERIALES Y METODOS

1. CEPAS.

El bacteriófago M13tg130 fue obtenido de Amersham ()

El plásmido pYKD59 contiene el gen que codifica para la PGA de *K. citrophila* bajo el control de su propio promotor (Prieto y col., 1990) y se obtuvo mediante una deleción *Pvu* I- *Sa*II del plásmido pYKH5 (García y Buesa, 1986)

Las cepas de *E. coli* ES1580 (*mutT1*, *thr-1*, Δ [*gpt-proA*]62, *hisG4*, *argE3*, *thi-1*) y ES1578 (*mutD*, *thr-1*, *leuB6*, *hisG4*, *argE3*, *thi-1*) se obtuvieron de la colección de Barbara Bachmann (*E. coli* Genetic Stock Center). Otras cepas de *E. coli* empleadas fueron las siguientes: MC1116 (Δ [*lac IPOZYA*]X74, *galU*, *galK*, *strA^S*, *spcA^F*, Δ [*ara-leu*], *recA56*), HB101 (*proA2*, *leuB*, *thi*, *recA*), TG1 (*supE*, *hsdD5*, *thi*, Δ (*lac-proAB*), *F'* [*traD36*, *proAB+*, *lacI_q*, *lacZDM15*], MC4100 (*araD139*, Δ (*lac IPOZYA*), U169, *rpsL*, *thi*, *mot*) y SBS688 (MC4100 con Δ *crp39*) (Maniatis y col., 1982; Sambrook y col., 1989). La cepa TD21 fue construida por procedimientos convencionales a partir de las cepas de *E. coli* ES1580 (*mutT1*, *thr-1*, Δ [*gpt-proA*]62, *hisG4*, *argE3*, *thi-1*) y ES1578 (*mutD5*, *thr-1*, *leuB6*, *hisG4*, *argE3*, *thi-1*) y también utilizando la cepa MC1116 (Δ [*ara-leu*]). Para ello se utilizó el bacteriófago P1 *kc* que se propagó en *E. coli* MC 1116 y se usó para transducir Δ [*ara-leu*] en *E. coli* ES1580. Se sabe que la cotransducción de los genes *thr* y *ara* sucede con una frecuencia del 2 % (Forney y col., 1989), por tanto, se seleccionaron colonias *Thr*⁺ en medio mínimo M9 con leucina, arginina, prolina e histidina y, a continuación, se seleccionaron colonias *Leu*⁻ también en medio mínimo M9 (Sambrook y col., 1989) ahora con arginina, prolina, histidina y ampicilina. A una colonia con el fenotipo adecuado (*mutT1*, Δ [*gpt-proA*], Δ [*ara-leu*], *argE3*, *hisG4*) se la denominó *E. coli* T67. El fenotipo *MutT* se chequeó siguiendo métodos descritos en la literatura (Cox y Yanofsky, 1969). Posteriormente se propagó el bacteriófago P1 *kc* en *E. coli* ES1578 y se usó para transducir *mutD5* en *E. coli* T67. Debido a que la cotransducción de *mutD* y *proA* ocurre con una frecuencia entre el 7 % y el 21 % (Degnen y Cox, 1974; Horiuchi y col., 1978), se seleccionaron en primer lugar colonias *Pro*⁺ sobre medio mínimo con leucina, arginina e histidina, y en segundo lugar se buscaron las colonias correspondientes al genotipo *mutD* siguiendo el procedimiento descrito por Degnen y Cox (1974). Se denominó *E. coli* TD21 a una colonia con el genotipo buscado (*mutT1*, *mutD5*, Δ [*ara-leu*], *argE3*, *hisG4*) y fue transformada con el plásmido pYKD59.

2. MEDIOS.

Los principales medios utilizados para el cultivo de las células han sido: Luria-Bertani (LB) y los medios mínimos M9, M63 y McConkey, suplementados adecuadamente en cada ensayo (Maniatis y col., 1982; Sambrook y col., 1989).

A continuación se describe el medio utilizado en el apartado 1.2 de resultados, con objeto de seleccionar mutantes con nuevas especificidades de sustrato: medio mínimo M9 (), con glucosa 22mM, tiamina 6 µg/ml, prolina 200 µM, Cm 34 µg/ml, y uno de los siguientes sustratos por placa, adipil-L-leu 200 µM, aminoadipil-L-leu 200 µM, glutaril-L-leu 200 µM y fenilacetil-L-leu 200 µM.

Los cultivos utilizados durante el estudio del efecto del cAMP sobre la represión por glucosa, se realizaron en medio mínimo M63 (KH₂PO₄ 0,1 M, NH₄Cl 20 mM, MgSO₄ 1 mM, FeCl₃ 1 µM, pH 7) suplementado con vitamina B₁ y tamponado con Tris-HCl 0,1 M, pH 8.

3. REACTIVOS.

La penicilina G, la penicilina G sulfóxido, y el 6-APA fueron cedidos por Antibióticos S.A. (León). La phenyl-Sepharose CL-4B, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), el diisopropilfluorofosfato (DFP), el ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico (NIPAB), el 4-dimetilaminobenzaldehído (PDAB), el fenil acetato, el etil acetato, el *n*-butil acetato, el 1-acetoxi-1,3-butadieno, el 4-acetoxibenzoato, el 4-acetamidobenzoato, el 4-nitrofenil formato, el nitrofenil acetato, el 4-nitrofenil propionato, el 4-nitrofenil butirato, el 4-nitrofenil valerato, el 4-nitrofenil trimetilacetato, el 2-nitrofenil acetato, la 4-nitroacetanilida, y el ácido fenilacético, procedían de Sigma (St. Louis, USA). También procedían de Sigma el cAMP, la cefaloridina, los anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con peroxidasa, la fluoresceína, la albumina de suero bovina y el ácido fenilacético. El cloruro de guanidinio, el 2,6-diclorofenol-indofenol y el ácido ascórbico se obtuvieron de BDH (Reino Unido). Las membranas de nitrocelulosa las suministró Schleicher y Schuell (Alemania). Los disolventes acetonitrilo e isopropanol se obtuvieron de Scharlan (España). El glicerol y la D-glucosa de Merck (Alemania); el reactivo de Bradford de Bio-Rad (Alemania), los deoxinucleótidos trifosfato a Pharmacia-Biotech (USA) y el material radiactivo a Amersham (). El *p*-nitrofenil fenilacetato fue proporcionado por el Dr. Richard Virden de la Universidad de Newcastle Upon Tyne (Reino Unido).

4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PGA.

4.1. Actividad sobre Penicilina G.

Uno de los principales ensayos empleados en la determinación de la actividad de la PGA sobre penicilina G se basa en la cuantificación de 6-APA. Esta cuantificación se realiza mediante derivatización a partir de su grupo amino. Con tal fin se ha empleado el reactivo *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDAB). El ensayo se basa en la reacción que tiene lugar entre el grupo amino del 6-APA y el grupo aldehído del PDAB para dar una base de Schiff que presenta una banda de absorción con un máximo centrado en torno a 415 nm (Balasingham y col., 1972). Modificando las condiciones originales se ha incrementado la sensibilidad del método. Las concentraciones de enzima y sustrato se especifican para cada ensayo en el pie de figura o de tabla correspondiente. La reacción se desarrolla a 37 °C en un volumen final de 0,3 ml en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 8, o en tampón citrato 50 mM, pH 5, deteniéndose ésta mediante adición de 0,9 ml de ácido acético al 20 %. Posteriormente se somete a centrifugación en una microcentrífuga, y sobre 0,9 ml del sobrenadante se añaden 0,3 ml de PDAB al 0,5 % en metanol. El máximo de absorbancia a 415 nm se alcanza en 2-3 minutos de reacción y permanece estable durante al menos 30 minutos.

La presencia de penicilina G no produce interferencia en el ensayo de valoración. La acidificación del medio de reacción detiene instantáneamente la hidrólisis enzimática de la penicilina G. Este método permite realizar la valoración enzimática de muestras de enzima purificada, así como de la enzima sin purificar en el caldo de fermentación. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160, empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

4.2. Actividad sobre sustratos cromogénicos.

La amplia especificidad que presenta la PA para el resto ácido o amino de los enlaces hidrolizados, permite el empleo de sustratos derivados del ácido fenilacético cuya hidrólisis supone la aparición de cromóforos. Estos sustratos permiten seguir la aparición del producto de la reacción enzimática sin necesitar la adición de reactivos de derivatización.

4.2.1. Actividad sobre el ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico.

La hidrólisis del ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico (NIPAB) se estudió registrando la cinética del incremento de absorbancia a 405 nm a 22 °C. Las concentraciones de enzima y sustrato utilizadas en cada caso, se indican en el pie de figura o tabla correspondiente. El volumen final de reacción empleado fue de 0,8 ml en

tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5. El coeficiente de extinción molar (ϵ) a 405nm a este pH es de $8730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kutzbach y Rauenbusch, 1974).

4.2.2. Actividad sobre los derivados ésteres de *p*-nitrofenol.

Los principales derivados ésteres de *p*-nitrofenol ensayados han sido el *p*-nitrofenilfenilacetato (PNPA) y el *p*-nitrofenilacetato (PNA), aunque también se han ensayado *p*-nitrofenilpropionato (PNP), *p*-nitrofenilbutirato (PNB), *p*-nitrofenilvalerato (PNV), *p*-nitroacetanilida (PNAc), *p*-nitrofenilformato (PNF), *p*-nitrofeniltrimetilacetato (PNT) y el *o*-nitrofenilacetato (ONA). El seguimiento de la hidrólisis de los diferentes ésteres de *p*-nitrofenol se realizó registrando el incremento de absorbancia a 400 nm a 22 °C. Al igual que con los ensayos anteriores, las concentraciones de enzima y sustrato utilizadas se especifican en cada caso. Los ensayos se realizaron en 0,8 ml de volumen final de reacción y en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5. A este pH el ion *p*-nitrofenolato presenta un coeficiente de extinción molar a 400 nm de $13680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Es necesario hacer dos consideraciones de interés: en primer lugar, indicar que los ésteres de *p*-nitrofenol se hidrolizan espontáneamente en ausencia de enzima, por lo que es necesario tener en cuenta la velocidad de hidrólisis espontánea; y, en segundo lugar, hay que dejar constancia de la baja solubilidad de estos compuestos, lo cual limita el rango de concentraciones de trabajo.

Las medidas de absorbancia se realizaron en los espectrofotómetros Shimadzu UV-160 o Cary 4 Varian, a 22- 25 °C.

4.3. Actividad sobre fenilacetato.

La hidrólisis del fenilacetato por la PGA se estudió siguiendo la liberación de fenol midiendo el aumento de absorbancia a 270 nm de modo continuo. Las concentraciones de enzima y sustrato utilizadas se especifican en cada caso. Los ensayos se realizaron en tampón fosfato sódico 100 mM a pH 7,5 y 22-25 °C en una cámara atemperada de un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. El valor de ϵ a este pH es de $1480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Greenzaid y Jenks, 1971). Para los cálculos de la actividad se ha tenido en cuenta la velocidad de hidrólisis espontánea del sustrato.

4.4. Actividad sobre derivados amídicos de L-leucina.

Se siguió la actividad de la PGA sobre los derivados de acil-L-leucina en tampón fosfato sódico 100 mM pH 8,0, o en tampón citrato 100 mM, pH 5,0. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 0,275 ml, siendo la temperatura de reacción empleada 22 ó 37 °C, según el caso particular ensayado. Las concentraciones de enzima y sustrato utilizadas se especifican en cada caso. Transcurrido el tiempo de reacción

adecuado, se para la misma por adición de 1 ml de reactivo de ninhidrina (20 mg/ml de ninhidrina en solución de 50% etanol (v/v) y 50% citrato sódico 0,2 M pH 5) y ebullición 10 min. Finalmente, 0,2 ml del volumen de reacción se diluyen hasta 1 ml con agua y se mide la absorción a 570 nm. La cuantificación colorimétrica de L-leucina con ninhidrina es un método ampliamente utilizado, que se basa en la formación de un compuesto azul, dicetohidrindilideno-dicetohidrindamina, originado al reaccionar la ninhidrina a pH ácido y 100 °C con el grupo amino del aminoácido (Moore y Stein, 1948).

4.5. Actividad sobre etil-fenilacetato.

Durante la hidrólisis de etil-fenilacetato por la PGA aumenta la concentración de protones lo que conduce a una acidificación del medio y la consiguiente disminución de la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína. Se ha aprovechado este hecho para seguir la reacción de hidrólisis del etil-fenilacetato fluorimétricamente. La fluoresceína es un indicador de pH ampliamente utilizado que presenta un espectro de emisión de fluorescencia con un máximo a 514 nm tras excitación a 489 nm. El intervalo de concentración de fluoresceína en el que se mantiene la relación lineal con la intensidad de fluorescencia, se encuentra entre 0,1 y 1 μ M, seleccionándose como concentración de trabajo 0,5 μ M. Las concentraciones de enzima y sustrato ensayadas se especifican en el apartado correspondiente. Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin Elmer MPF-3L a 22 °C en una cubeta de cuarzo termostatzada de 1,0 cm de paso óptico, y en presencia de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7. Los monocromadores de excitación y emisión se ajustaron a 489 y 515 nm, respectivamente, con una anchura de rendija para ambos de 0,5 mm.

5. EFECTO DEL pH EN LA HIDROLISIS DEL *p*-NITROFENILACETATO.

Se determinó el perfil de la variación de actividad frente al pH en la catálisis del PNA por la PGA. En función del intervalo de pH ensayado se utilizaron los siguientes tampones: tampón acetato 100 mM entre pH 5,0 y 6,0; tampón fosfato sódico 100 mM entre pH 6,0 y 8,0 y tampón Tris-HCl 100 mM entre pH 8,0 y 9,0. La reacción de hidrólisis transcurrió en un volumen de 0,15 ml, durante 5 minutos a 25 °C, siendo las concentraciones de enzima y sustrato $1,6 \times 10^{-6}$ M y 2×10^{-3} M, respectivamente. El porcentaje final de acetonitrilo fue del 2 %. Las medidas de absorción a 400 nm, para cuantificar la actividad, se realizaron inmediatamente después de añadir 0,9 ml de tampón fosfato sódico 2 M, pH 7,5.

6. INFLUENCIA DEL ACETONITRILLO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

El disolvente empleado para disolver los ésteres de *p*-nitrofenol fue el acetonitrilo (AcN). Se siguió la hidrólisis del PNA en presencia de diferentes porcentajes de AcN y se calculó la actividad específica para cada uno de ellos. La reacción se desarrolló a 25 °C en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5, en un volumen final de 0,8 ml con concentraciones de enzima y sustrato de $6,2 \times 10^{-8}$ M y 5×10^{-5} M, respectivamente. El porcentaje mínimo empleado fue de 0,1 % de AcN (v/v).

Se ha calculado el efecto del porcentaje final de acetonitrilo sobre los parámetros cinéticos (k_{cat}/K_M) de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato por la PGA. Las reacciones se han desarrollado en un volumen final de 1 ml en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5, a 22 °C. Las concentraciones de enzima y sustrato empleadas fueron $2,85 \times 10^{-7}$ M y 1×10^{-6} M, respectivamente. El porcentaje final de acetonitrilo varió entre 1 % y 9 % (v/v).

7. INHIBICION POR FLUORURO DE FENILMETILSULFONILO.

7.1. Inhibición de la hidrólisis de penicilina G.

La capacidad del fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para inactivar la PGA por modificación covalente de un único residuo de serina que se encuentra situado en el centro activo de la enzima, permite emplear este reactivo para valorar centros catalíticos.

Se incubaron diferentes alícuotas de 0,3 ml de PGA 170 nM y de ADL 150 nM, con 10 µl de PMSF en isopropanol a diferentes concentraciones, entre 0 y 200 nM. La mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción de modificación es instantánea. A continuación se añaden 30 µl de penicilina G 17 mM en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,8. La determinación de la actividad enzimática remanente se realiza mediante valoración con PDAB (ver apartado 4.1), tras incubar la muestra durante 10 minutos a 37 °C en un baño con agitación.

La concentración molar de centros activos corresponde a la concentración de PMSF que permite la inactivación total de la enzima, y se obtiene del punto de corte con el eje de abscisas que resulta de la extrapolación del tramo lineal inicial de la representación de actividad remanente frente a concentración de PMSF. Si las preparaciones de PA empleadas están constituidas por una población homogénea de moléculas activas de enzima, la concentración de centros activos así determinada coincide con la concentración de proteína calculada espectrofotométricamente.

7.2. Inhibición de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato.

También se ha estudiado la inhibición producida por el PMSF sobre la PGA durante la hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato. La actividad se siguió como se ha explicado previamente para determinar la hidrólisis de los ésteres de *p*-nitrofenol. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 0,8 ml en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5 a 25 °C. Se preincubó la enzima (1×10^{-7} M) con diferentes concentraciones de PMSF desde 0 hasta 8×10^{-7} M, durante 5 minutos a temperatura ambiente, antes de comenzar la reacción por adición del sustrato (5×10^{-5} M). El porcentaje final de isopropanol fue de 0,2 % (v/v) y no afectó la actividad enzimática.

8. INHIBICION POR ACIDO FENILACETICO

Se ha determinado la naturaleza de la inhibición del ácido fenilacético sobre la PGA de *K. citrophila* nativa y sobre la mutante, durante la hidrólisis de dos sustratos de diferente naturaleza, NIPAB y PNA.

8.1. Inhibición de la hidrólisis de NIPAB.

La determinación de la actividad enzimática se ha calculado según el protocolo descrito anteriormente (ver apartado 4.2.1). Se han calculado las velocidades iniciales de la hidrólisis de concentraciones no saturantes de sustrato entre 2×10^{-5} M y 2×10^{-4} M, y concentraciones de inhibidor entre $3,7 \times 10^{-5}$ M y $1,7 \times 10^{-4}$ M. La concentración de enzima fue de $4,3 \times 10^{-8}$ M, tanto con la enzima nativa como con la mutante. Se preincubó la enzima con el ácido fenilacético durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de comenzar la reacción con la adición del sustrato. La reacción se desarrolló en un volumen final de 0,8 ml en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5 a 22 °C.

8.2. Inhibición de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato.

Los ensayos para caracterizar el mecanismo de inhibición por el ácido fenilacético se han realizado como en el caso anterior, determinando la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis de la enzima, en este caso sobre el *p*-nitrofenilacetato. El intervalo de concentración de sustrato empleado se encuentra entre $1,56 \times 10^{-4}$ M y $2,18 \times 10^{-5}$ M, siendo la concentración de la enzima $2,3 \times 10^{-7}$ M. La concentración de inhibidor varió entre $2,2 \times 10^{-4}$ M y $2,2 \times 10^{-3}$ M. Se preincubó la enzima con el inhibidor 5 minutos a temperatura ambiente antes de añadir el sustrato. El volumen final de la reacción, que transcurrió a 25 °C, fue de 0,8 ml en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5. El sustrato se disolvió en acetonitrilo (AcN), siendo el porcentaje final de AcN en la reacción de 0,5 % (v/v).

9. OTROS ESTUDIOS DE INHIBICION DE LA HIDROLISIS DE *p*-NITROFENILACETATO.

9.1. Inhibición por diisopropilfluorofosfato.

Se sabe que el diisopropilfluorofosfato (DFP) es un inhibidor específico de serín-proteasas, que sin embargo, no actúa sobre la PGA de *E. coli* (Kutzbach y Rauenbusch, 1974). Se ensayó su efecto sobre la PGA de *K. citrophila* durante la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato. Se utilizó un volumen de reacción de 0,8 ml de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5. La concentración de enzima utilizada fue de 1×10^{-7} M y la de DFP varió entre 0 y 1 mM. Se preincubó 10 minutos a temperatura ambiente. La concentración de sustrato fue 5×10^{-5} M. El DFP se disolvió en isopropanol (0,2 % (v/v) en el volumen de reacción).

9.2. Inhibición por penicilina G.

El análisis de la inhibición por competición con la penicilina G se utilizó para estudiar la especificidad de la hidrólisis del PNA por la PGA. El ensayo se realizó en las mismas condiciones que con el DFP, utilizando una concentración de penicilina G de 0 a $6,8 \times 10^{-4}$ M.

9.3. Inhibición por penicilina G sulfóxido.

La penicilina G sulfóxido es un inhibidor competitivo de la PGA que se utilizó para estudiar la especificidad de la hidrólisis del PNA por la PGA. Las concentraciones de penicilina G sulfóxido empleadas variaron de 0 a $1,2 \times 10^{-4}$ M. El ensayo se realizó en las mismas condiciones que los de DFP o penicilina G.

9.4. Inhibición por ácido 6-aminopenicilánico.

El mismo ensayo de los apartados anteriores sirvió para estudiar el efecto del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), conocido inhibidor no competitivo de la PGA (Balasinhram y col. 1972). El 6-APA se utilizó en un intervalo de concentración de 0 a 5×10^{-2} M.

10. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS EN ESTADO ESTACIONARIO.

La caracterización cinética de las reacciones enzimáticas catalizada por la PGA en estado estacionario se ha llevado a cabo en base a la ecuación de Michaelis-Menten. El correspondiente análisis proporciona los valores de la constante de Michaelis, K_M y de la constante catalítica (o número de recambio), k_{cat} .

10.1. Método de las velocidades iniciales.

El cálculo de los parámetros cinéticos enzimáticos mediante la determinación de velocidades iniciales de reacción será tanto más correcto cuanto menor sea la modificación de las condiciones iniciales del ensayo. Aunque se ha descrito cómo corregir los datos experimentales para obviar este inconveniente, es recomendable optimizar las condiciones de ensayo de modo que las cinéticas de aparición de producto correspondan a líneas rectas, lo que significa que, en el intervalo de tiempo analizado, no se ha modificado la velocidad de reacción existente en el instante inicial. En consecuencia, es necesario realizar un estudio previo con el objeto de determinar el intervalo de concentraciones de enzima y sustrato, y la escala de tiempo a emplear. Conviene tener en cuenta que es deseable utilizar disoluciones diluidas de enzima, con el fin de evitar la existencia de una población heterogénea de formas enzimáticas activas procedentes de la agregación de la proteína. Asimismo, el empleo de tiempos cortos de reacción minimiza el efecto de una posible inestabilidad enzimática durante el ensayo, si bien cabe reseñar que la PGA posee gran estabilidad térmica. La limitación de las condiciones de ensayo se encuentra en la sensibilidad del método de valoración empleado.

Una vez elegidas las condiciones de ensayo, las velocidades iniciales de reacción se calculan realizando un ajuste por regresión lineal de las curvas de progreso obtenidas. Los parámetros cinéticos se determinan a partir de un ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la línea recta que se obtiene tras linealizar la ecuación de Michaelis-Menten según la representación de Hanes-Woolf.

10.2. Método continuo.

Este método ha sido utilizado con algunos de los sustratos cromogénicos, cuando se ha dispuesto de un ordenador conectado al espectrofotómetro que recogiese las lecturas de absorbancia correspondientes a las cinéticas estudiadas. Las curvas de progreso de las cinéticas se han analizado utilizando un programa de regresión por mínimos cuadrados no lineal (Duggleby, 1981).

11. ESTUDIOS EN EL ESTADO PRE-ESTACIONARIO.

11.1. Equipo de flujo detenido.

Las medidas en el estado pre-estacionario se realizaron en un equipo de flujo detenido Hi-Tech SF-3L (Hi-Tech Scientific, Salisbury, Wiltshire, U.K.) en una cubeta termostatzada a $22 \pm 0,1$ °C, de 1 mm de paso óptico en los estudios de fluorescencia y de 1 cm de paso óptico en los estudios de absorbancia. Las condiciones del equipo en los estudios de fluorescencia se detallan a continuación: 2 bares de presión, 3 mm de anchura de rendija y una constante de tiempo de 30 ó 100 μ s. En los estudios de absorbancia fueron las siguientes: 1,5 bares de presión, 1 mm de anchura de rendija y una constante de tiempo de 33 μ s.

La formación de producto se registró midiendo absorbancia a 400 nm, recogiénose los datos en un ordenador Apple II. Una jeringa contenía el sustrato y la otra la enzima, siendo el volumen final por reacción de 0,3 ml. Las reacciones se desarrollaron en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5, en presencia de 1 % (v/v) de AcN.

11.2. Determinación del tiempo muerto del equipo de flujo detenido.

El tiempo muerto del equipo se determinó mediante el seguimiento de la reacción de amortiguación del 2,6-diclorofenol-indofenol, o reducción de un cromóforo, con diferentes concentraciones de ácido L-ascórbico (Tonomura y col., 1978). El 2,6-diclorofenol-indofenol se preparó a una concentración de 1mM en NaCl 0,1 M, y después se diluyó a una concentración final de 0,15 mM en tampón acetato 0,1 M, pH 5. El ácido ascórbico se preparó a una concentración 100 mM en NaCl 0,1 M y, posteriormente, se ajustó a pH 5 con hidróxido sódico. En el equipo de flujo detenido se mezclaron diferentes concentraciones de ácido ascórbico, en el intervalo de 0 a 50 mM de concentración final, con el 2,6-diclorofenol-indofenol a 0,075 mM final, registrando la variación de absorbancia a 606 nm. La pendiente, que resulta de la representación gráfica del logaritmo neperiano de la amplitud frente a la constante de decaimiento, nos indica el tiempo muerto del equipo.

11.3. Determinación de los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario.

Para determinar los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario todos los ensayos se han efectuado en condiciones de acilación cumpliéndose las siguientes condiciones:

- $[S_0] > [E_0]$
- $[S_0] \gg K_M$ (app.)
- $k_2 \gg k_3$

Las medidas realizadas en el espectrofotómetro del equipo de flujo detenido, se han recogido automáticamente en un ordenador Apple II, donde posteriormente se han analizado con un programa adecuado para el análisis de cinéticas rápidas proporcionado por el software del ordenador. Por cada punto ensayado se han realizado un mínimo de cuatro cinéticas individuales que han permitido analizar estadísticamente los resultados obtenidos. Los datos han sido procesados en paralelo con otro programa diferente diseñado por el Dr. Richard Virden (Universidad de Newcastle Upon Tyne, U.K.), que ha proporcionado los mismos resultados.

Del análisis efectuado se han calculado los valores de las constantes de acilación (k_2) y desacilación (k_3) del intermedio acil-enzima que forma parte del mecanismo catalítico, así como la constante de unión (K_S). Un proceso más detallado de las ecuaciones cinéticas que se han empleado se puede encontrar en el apéndice de la sección de Resultados.

Se ha comprobado que la óptica de los diferentes espectrofotómetros utilizados no presentara diferencias significativas, que pudieran interferir en el cálculo de los parámetros cinéticos, mediante la cuantificación de diferentes diluciones del reactivo coloreado *p*-nitrofenolato.

12. PRODUCCION Y PURIFICACION DE LA PGA.

La PGA, tanto nativa, como la mutante ADL, se produjeron y purificaron como se describe a continuación. Se cultivaron células *E. coli* HB101(pYKD59) y *E. coli* HB101(pADL) durante 48 horas, a 30 °C, en 4 litros de medio LB con 35 µg/ml de cloranfenicol, para obtener respectivamente la enzima nativa y la mutante ADL. Transcurridos dos días, los cultivos se sometieron a centrifugación a 10.000 g 10 min a 4 °C, y el sedimento se resuspendió en 700 ml de Tris-HCl 33 mM, pH 8, con EDTA 33 mM y un 20 % de sacarosa, dejándose 30 min a temperatura ambiente. Se recogieron las células por centrifugación, de nuevo a 10.000 g 10 min a 4 °C, y se resuspendieron en 700 ml de agua a 4 °C. De esta manera se produce el choque osmótico que libera al medio la fracción periplásmica que contiene la enzima. Una vez eliminados los restos celulares, se concentró el sobrenadante añadiendo sulfato amónico con agitación continua hasta que alcanzó una concentración de 0,75 M. Después de realizar una centrifugación a 14.000 g durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante se cargó en una columna de phenyl-Sepharose CL-4B (Sigma, USA) de 32 x 2,5 cm, previamente equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 con sulfato amónico 0,75 M. Las PGA se

eluyeron en un gradiente decreciente de sulfato amónico de 0,5 a 0,2 M. Las fracciones con actividad acilasa se agruparon y se dializaron frente a tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8. A continuación se cargaron en una columna de hidroxipatito HPT (Bio-Rad, Alemania) de 9 x 3 cm, equilibrada en el mismo tampón. La elución se realizó mediante un gradiente creciente de fuerza iónica con tampón fosfato sódico de 10 a 300 mM, pH 6,8. Las fracciones que contenían las acilasas se agruparon y almacenaron a -20 °C.

En cada proceso de purificación se obtienen unos 30-40 mg de PGA. Como criterio de pureza de las proteínas se utilizaron electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. El seguimiento de la actividad durante la purificación se realizó sobre penicilina G con la PGA nativa y sobre adipil-L-leucina con la enzima mutante, ADL.

13. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sodico (SDS) utilizando geles de poliacrilamida en placa al 12 % o al 15 % el gel separador y una parte de gel concentrante al 3 % o 5 % (Laemmli, 1970). Se empleó un equipo Miniprotean de Bio-Rad. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS al 2 %; β -mercaptoetanol al 5 %; glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0,005 %). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y corriente constante (50 mA), utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS al 0,1 %. Los geles se revelaron con azul brillante de Coomassie R-250 según se describe en Swank y Munkress (1971). Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular se adquirieron de la casa comercial Bio-Rad.

14. CUANTIFICACION DE PROTEINA.

La cuantificación molar de la proteína existente en preparaciones puras de PGA ha sido determinada mediante medidas de absorbancia en la región ultravioleta o mediante el método de Bradford, obteniendo resultados muy similares.

14.1. Análisis espectrofotométrico.

El espectro de absorción ultravioleta de la PGA posee un máximo centrado en torno a los 279,5 nm, un mínimo a 249 nm y un hombro en torno a los 290 nm. La relación entre los valores de absorbancia en el máximo y en el mínimo es 2,6. El coeficiente de extinción molar a 280 nm de la PGA puede ser estimado a partir de su composición de aminoácidos de acuerdo a la ecuación propuesta por Wetlaufer (1962). El número total de residuos de tirosina y triptófano existentes en la PGA fue obtenido de

la secuencia (Barbero y col., 1986). El valor de $\epsilon_{280\text{ nm}}$ así calculado es de $22,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

14.2. Método de Bradford.

El método de Bradford (1976) se ha empleado para determinar la concentración de proteína, tanto en las preparaciones de PGA pura como en los extractos enzimáticos. La recta patrón se ha construido con albúmina de suero bovino.

15. AISLAMIENTO DE LAS SUBUNIDADES α Y β DE LA PGA.

Las subunidades α y β que constituyen la PGA activa se separaron por el método descrito por Lindsay y Pain (1990). Una preparación de 2 mg de PGA pura se desnaturalizó en cloruro de guanidinio 6 M en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5, y se mantuvo a temperatura ambiente 1 hora, y a continuación, 12 horas a 4 °C. La PGA desnaturalizada se aplicó en una columna de filtración en gel de Superosa 12 HR10/30 (Pharmacia, Suecia), previamente equilibrada en el mismo tampón. La elución se efectuó a 20 ml/h.

La renaturalización de la PGA se consiguió mezclando las subunidades mol a mol y dializando frente a tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,5, durante 12 horas a 4 °C. Tras centrifugar, para eliminar restos de sal o posibles agregados proteicos, se concentró el sobrenadante.

16. ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR.

Los espectros de dicroísmo circular de las PGA, nativa y mutante, se realizaron en un dicrógrafo Jobin-Yvon IV calibrado a 304 nm empleando epianosterona (1,25 mg/ml) en dioxano. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico para los espectros realizados en el ultravioleta-próximo (320-250 nm), y cubetas de 0,1 cm de paso óptico para el ultravioleta-lejano (200-250 nm). La elipticidad molar por residuo se expresó en unidades de $\text{grados} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$.

Las muestras de proteínas se centrifugaron en una microfuga antes de realizar los espectros, para eliminar la posibilidad de que algún agregado pudiera interferir la medida. Cada espectro corresponde a una media de cuatro espectros individuales de la proteína y del disolvente. Los espectros se realizaron a 22 °C.

17. PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA.

Las predicciones de estructura secundaria de las secuencias peptídicas, se han realizado utilizando los programas PEPTIDESTRUCTURE y PEPLOT del Wisconsin Package del Genetics Computer Group Inc.

El programa PEPTIDESTRUCTURE realiza entre otras las siguientes predicciones respecto de la secuencia de aminoácidos:

- Estructura secundaria según el método de Chou-Fasman (1978).
- Estructura secundaria según el método de Garnier-Osguthorpe-Robson (1978).
- Perfil de hidrofobicidad de acuerdo al método de Kyte-Doolittle o Hopp-Woods (1981).

- Probabilidad de superficie de acuerdo al método de Emini (1985).

El programa PEPLOT realiza predicciones similares, que incluyen entre otras:

- Estructura secundaria según el método de Chou-Fasman (1978).
- Momento hidrofóbico de Eisenberg (1984).
- Perfil hidropático de Kyte y Doolittle (1982).
- Identificación de hélices transmembrana no polares (Goldman y col., 1986).

18. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -LACTAMASA.

La actividad β -lactamasa se determinó mediante el método espectrofotométrico de Ross y O'Callaghan (1975). Se utilizaron 0,05 ml de extracto enzimático en 0,5 ml de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7, iniciándose la reacción por la adición del sustrato, cefaloridina hasta 0,1 mM. La reacción se desarrolló en una cubeta de cuarzo de 1 cm, termostalizada a 25 °C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. La hidrólisis del anillo β -lactámico se siguió registrando la disminución de absorbancia a 255 nm durante 5 min.

Se calcularon los mmoles de cefaloridina hidrolizados empleando un coeficiente de extinción molar a 255 nm de $14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el anillo β -lactámico a pH 7,0.

19. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA.

El ensayo de la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se basó en una modificación del método espectrofotométrico descrito por Shaw (1975). Se emplearon 0,02 ml de extracto enzimático y 0,6 ml de mezcla de reacción para ajustar a cero la medida a 412 nm. A continuación se añadió el cloranfenicol a una concentración final de 0,1 mM para comenzar la reacción. La mezcla de reacción se preparó momentos antes de su empleo, debido a su inestabilidad, y consistía en: 0,4 mg/ml de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8, y acetil CoA 0,1 mM. La reacción

enzimática se desarrolla en una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico, en el interior de la cámara termostatzada a 37 °C de un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

El ensayo de la actividad CAT se aprovecha de la formación de un grupo sulfhidrilo libre en el acetyl CoA en paralelo a la transferencia del grupo acilo al cloranfenicol por la CAT. El CoA reducido reacciona con el DTNB produciendo una mezcla de disulfuro de CoA y ácido tionitrobenzoico más un equivalente molar de 5-tio-2-nitrobenzoato libre. Este último puede seguirse espectrofotométricamente a 412 nm y presenta un coeficiente de extinción molar de $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

20. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

Los niveles de β -galactosidasa se determinaron de acuerdo al protocolo de Miller (1972). Se ensayaron diferentes alícuotas de medio de cultivo en función de los niveles de β -galactosidasa producidos por cada clon, entre 0,02 y 0,1 ml, completando a un volumen final de 0,5 ml con tampón Z (fosfato disódico 0,06 M, fosfato monosódico 0,04 M, KCl 0,01 M, sulfato magnésico 0,001 M y β -mercaptoetanol 0,05 M), pH 7. Las células se permeabilizaron con cloroformo y SDS. La reacción comenzó al añadir 0,1 ml del sustrato, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (4 mg/ml). Tras un periodo variable de 5 a 15 minutos a 28 °C, la reacción se detiene con 0,25 ml de carbonato sódico 1M. Los restos celulares se eliminan por centrifugación en microfuga y se mide la reacción en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 a 420 nm. La medida es estable durante unos 20 min a 4 °C.

Las unidades de β -galactosidasa se calcularon en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades } \beta\text{-gal} = [\text{Abs. } 420 \text{ nm} / t (\text{min}) \times \text{vol (ml)} \times \text{Abs. } 600 \text{ nm}] \times 1000$$

21. OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PGA

Se obtuvieron anticuerpos policlonales inmunizando conejos con la enzima PGA purificada. Se utilizaron dos dosis de 0,280 μg de proteína en solución salina. La primera en adyuvante Freund completo (1:1 v/v) y la segunda en adyuvante Freund incompleto (1:1 v/v), dejando transcurrir un mes entre ambas. La administración del antígeno se realizó de forma subcutánea (Schmid y Böck, 1981). Después de una semana desde la segunda inmunización, se extrae el suero y se limpia de restos celulares, tras eliminar el coágulo sanguíneo por centrifugación del suero a 5000 rpm 5 min. Posteriormente se inactivan las proteínas del complemento incubando a 56 °C durante 15 minutos. Se ensayó la especificidad del suero obtenido, así como la posible reacción inespecífica del suero pre-inmune, encontrándose una buena relación señal/reacción específica del suero anti-PGA en una dilución (1/5000). Para evitar la detección de bandas inespecíficas en el western-blot, formadas por la posible reacción cruzada del suero con otras

proteínas celulares, diferentes de la PGA, se preincubó el antisuero con un extracto celular de la cepa *E. coli* HB101 que posteriormente se iba a emplear para expresar la PGA sin transformar. Para realizar los estudios de producción a diferentes temperaturas y el procesamiento de la PGA se utilizó la cepa *E. coli* HB101 transformada con el plasmido pYKD59.

22. TECNICA DE "WESTERN-BLOT".

Las proteínas purificadas y las proteínas de los extractos crudos, una vez separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleider y Schuell) según se describe en Maniatis y col., (1982). La membrana se saturó con leche desnatada al 5 % (p/v) en tampón PBS (fosfato sódico 10 mM, pH 7,4; NaCl 140 mM) mediante incubación a 4 °C durante 12 horas. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente con agitación suave durante 4 horas en presencia del suero anti-PGA. Después de tres lavados con PBS que contenía Tween al 0,1 % (v/v), 10 minutos por lavado, la membrana se hizo reaccionar durante una hora a temperatura ambiente y suave agitación con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa (Sigma). Finalmente, tras dos lavados con PBS con Tween al 0,1 % (v/v) y un lavado con PBS sólo, las bandas de reacción con los anticuerpos se visualizaron con peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol (Sigma).

23. MANIPULACIONES DEL DNA

23.1. Transformación de *E. coli*.

La transformación de las cepas empleadas se ha realizado indistintamente por el método del RbCl (Sambrook y col., 1989) o por electroporación (). También se ha utilizado el método de CaCl₂ para la cepa de *E. coli* TG1 (Messing, 1983).

23.2. Obtención de plásmidos.

Los plásmidos fueron obtenidos por el método rápido de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989).

También se ha empleado la purificación de DNA por centrifugación en gradiente de CsCl (Maniatis y col. 1982)

23.3. Manipulación del DNA.

La manipulación de las enzimas empleadas para digerir, ligar, hacer romos los extremos del DNA, etc., y sus tampones correspondientes se utilizaron siguiendo las

indicaciones recomendadas por las casas suministradoras. Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de Boehringer Mannheim (Alemania), Amersham, Pharmacia (Suecia) y New England Biolabs (U.K.). Amersham suministró la DNA ligasa y la polinucleótido quinasa del fago T4, así como el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*.

24. ELECTROFORESIS DEL DNA EN GELES DE AGAROSA.

Para realizar las electroforesis del DNA se utilizaron geles con 0,7 % o 1 % de agarosa (Bio-Rad) en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,1), empleando el mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añadió 1/5 - 1/10 de su volumen de una solución compuesta por FicoII 400 al 30 % (p/v), azul de bromofenol al 0,2 % (p/v), xilencianol al 0,2 % y EDTA 40 mM, pH 8,0. La electroforesis se realizó a 100-150 V durante 60-90 minutos, y una vez finalizada los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 µg/ml) para su visualización con radiación ultravioleta. Como marcador de tamaño se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción *BstEII* o el DNA del fago φX174 digerido con la enzima de restricción *HaeIII*.

25. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS FRAGMENTOS DE DNA.

Los fragmentos resultantes de la digestión del DNA con las enzimas de restricción se aislaron y purificaron por tres métodos diferentes.

25.1. Geles de agarosa de bajo punto de fusión.

Algunos fragmentos de DNA se aislaron mediante geles de bajo punto de fusión (Bio-Rad) al 1- 1,4 % en tampón TAE (ver apartado 24). Una vez realizada la electroforesis, se cortó en cada caso la banda deseada del gel y se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM) con NaCl 0,25 M. La agarosa se fundió manteniéndola a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, la muestra se trató con fenol y posteriormente con éter (v/v), incubándola después a 65 °C durante 10-15 minutos con el fin de eliminar los posibles restos de éter. El DNA se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto, incubando a 70 °C 45 minutos. Tras una centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos, se lavó con etanol al 70 % y, finalmente, se disolvió en un volumen adecuado de tampón TE.

25.2. Técnica del "GeneClean".

Los fragmentos que se desean aislar se separan mediante una electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente, se recortan las bandas de interés y el DNA se purifica de la agarosa mediante su adsorción a pequeñas partículas de vidrio siguiendo la técnica del "GeneClean" tal y como indica la casa comercial (Bio 101 Inc., La Jolla, CA, USA).

25.3. Técnica de la β -agarasa.

El empleo de esta técnica también requiere, como las anteriores, la separación previa de los fragmentos que se quieren purificar por electroforesis en geles de agarosa, recortando posteriormente las bandas. Esta técnica se basa en la utilización de la enzima β -agarasa que hidroliza la agarosa en sus subunidades u oligosacáridos, liberándose el DNA. Una vez fundida la agarosa que contiene el DNA de interés se deja actuar a la enzima una hora a 40-42 ° C. Si se emplea agarosa de bajo punto de fusión se mejora la eficiencia de recuperación de DNA del método. Tras fenolizar y precipitar el DNA se resuspende en el volumen adecuado de tampón TE. La enzima β -agarasa y su correspondiente tampón se obtuvieron de BioLabs (New England, USA).

26. SECUENCIACION DEL DNA.

La secuenciación del DNA se realizó según el método de Sanger y col. (1977), utilizando la técnica de Zhang y col. (1988) para la secuenciación del DNA de doble cadena. Para la reacción de secuenciación se empleó el kit de *Sequenase* (United States Biochemicals) y como nucleótido marcado radiactivamente, [α - 35 S] dATP (Amersham), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

27. MUTAGENESIS *IN VIVO*.

El plasmido pYKD59 se mutagenizó utilizando la cepa de *E. coli* TD21 (*mutT1*, *mutD5*, Δ [*ara-leu*], *argE3*, *hisG4*). Las células de *E. coli* TD21 conteniendo el plásmido pYKD59 se trataron como describen Forney y col. (1989). Las células de *E. coli* TD21 (pYKD59) se cultivaron a 37 °C durante 18 horas en medio LB (Sambrook, 1989) con cloranfenicol a 35 μ g/ml. Esta cepa tiene una DNA polimerasa cuya actividad 3'-5'-exonucleolítica resulta defectiva, y produce una alta frecuencia de mutación cuando la cepa crece en medio rico (Deguen y Cox, 1974; Schaaper, 1989). Transcurridas 18 horas, las células se centrifugaron, se cultivaron durante tres horas en 0,9 % NaCl para eliminar la leucina intracelular de las células, y se sembraron en placas con medio selectivo. Los mutantes de *E. coli* TD21 (pYKD59) se seleccionaron por su capacidad de crecer en un medio mínimo M9 (Sambrook, 1989) que contenía 50 μ g/ml de adipil-L-leucina como

única fuente de L-leucina. A los 6 días de incubación aparecieron en las placas varias colonias. Los plásmidos fueron aislados y se utilizaron para transformar células de *E. coli* HB101 (*proA*, *leuB*) (Sambrook, 1989). Las células transformadas fueron capaces de crecer en adipil-L-leucina como única fuente de L-leucina, comprobando el genotipo con los correspondientes controles sin adipil-L-leucina.

28. MUTAGENESIS DIRIGIDA.

Las mutagénesis dirigidas se realizaron mediante el sistema de mutagénesis *in vitro* de Amersham Internacional siguiendo el protocolo que detallan los fabricantes. Los oligonucleótidos fueron sintetizado por Isogen Bioscience.

29. AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR

La técnica del PCR (Polymerase Chain Reaction) ha sido una herramienta muy valiosa para la Biología Molecular desde su descubrimiento y desarrollo (Mullis y Faloona, 1987; Saiki y col., 1985). A través de la tecnología PCR, las cadenas de DNA pueden copiarse y amplificarse exponencialmente de manera selectiva en pocas horas. La amplificación mediante PCR es un método conceptualmente muy sencillo que mimetiza la replicación natural del DNA, que principalmente consiste en la repetición sucesiva de tres pasos: i) desnaturalización del DNA de cadena doble, ii) anillamiento del DNA con oligonucleótidos específicos, que marcarán la región del DNA que se va a amplificar, y iii) amplificación con la DNA polimerasa. Cada uno de estos pasos requiere unas determinadas condiciones de temperatura y tiempo, que deben ajustarse para cada caso particular.

Hay que resaltar que todas las reacciones de amplificación realizadas han necesitado un 15 % de glicerol en el volumen final de reacción, para evitar la formación de estructura secundaria del DNA plasmídico, que ha dificultado en determinados casos el proceso de amplificación.

Se ha empleado un equipo de Pharmacia LKB y las enzimas *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene) y ReplithermTM termoestable DNA polimerasa (Epicentre, USA). Por cada proceso de amplificación se consiguió aproximadamente un 1 µg de fragmento amplificado. Los productos de la amplificación se purificaron por las técnicas descritas en el apartado 25 o bien mediante el empleo de columnas de Promega (USA).

29.1. Mutagénesis al azar mediante PCR de baja fidelidad.

Para conseguir la amplificación del fragmento de DNA que codifica los residuos Pro43-Met71 de la secuencia de aminoácidos de la PGA de *K. citrophila* se han empleado las siguientes condiciones de reacción: Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM,

MgCl₂ 6,5 mM, MnCl₂ 0,5 mM, gelatina 0,01 % (v/v), Triton X-100 al 0,1 % (v/v) y dNTPs (dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 1 mM y dATP 0,2 mM). Se utilizó una cantidad final de oligonucleótidos de 900 nM, 1 ng/μl del plásmido pYKD59 que sirvió de molde y 2U de enzima Replitherm DNA polimerasa (Epicentre). El volumen final de reacción fue de 100 μl y contenía un 15 % de glicerol (v/v). Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación: KLUSEC0,5- (5'-GCAAGCCCGCCAACCGAG-3') y KLUSEC1 (5'-CTCGGAGACGGTCCCCT GAG-3'). La amplificación se llevó a cabo utilizando el siguiente programa: 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 50 °C y 2 minutos a 72 °C, durante 35 ciclos. Las muestras se introducen en el equipo de PCR tras haber sido desnaturalizadas en un baño a 100 °C durante 5 minutos.

29.2. Mutagénesis mediante PCR utilizando un oligonucleótido degenerado.

Las condiciones de reacción que se emplearon fueron las siguientes: Tris-HCl 20 mM pH 8,75, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgCl₂ 2 mM, Triton X-100 0,1 %, BSA 0,1 mg/ml, dNTPs 250 μM, glicerol 15 % (v/v), 900 nM de cada oligonucleótido, 1 ng/μl del plásmido pYKD59, y 2U de la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene) en un volumen final de 100 μl. Los oligonucleótidos que se utilizaron se indican a continuación: KLUSEC1 (descrito anteriormente) y KLUMUTA2- (5'-CGCGATGAATACGGCATGCNS (NNS)g C GACTG TTTTACGGCTATG-3'), donde N puede ser: A, C, G, T, y S sólo puede ser C, G, para evitar la formación de codones de terminación. El programa empleado para realizar la amplificación fue el mismo que al realizar la PCR al azar.

29.3. Amplificación del promotor del gen *pac* de *E. coli* y *K. citrophila*.

La amplificación se realizó en las siguientes condiciones de reacción: Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tween 20 al 0,005 % (v/v), NP-40 al 0,005 % (v/v), gelatina 0,001 % (v/v), dNTPs 250 μM, oligonucleótidos 900 nM, plásmido 1 ng/μl, glicerol 15 % (v/v) y 2U de la enzima ReplithermTM termoestable DNA polimerasa (Epicentre), en un volumen final de 100 μl. Para la amplificación del promotor del gen *pac* de *E. coli* los oligonucleótidos empleados fueron: PEC1 (5'-CCCAAGCTTTTCATTGTATCCTTCTGG-3') y PEC2- (5'-CGCGGATCCAG CGGTGAATAAAGCG-3'). Como molde se utilizó el plásmido pGA1. El programa utilizado se indica a continuación: 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 65 °C y 2 minutos a 72 °C, durante 35 ciclos. Para la amplificación del promotor del gen *pac* de *K. citrophila* se emplearon los oligos PKC1 (5'-CCCAAGCTTTTCATTGTATCC TCTTGC-3') y PKC2- (5'-CGCGGATCCAGT AAAAGTAAAATTG-3'), el plásmido pYKD59 sirvió de molde. Se utilizó el siguiente programa: una primera etapa de 7 ciclos, 1 minuto a 98

°C, 2 minutos a 50 °C y 2,5 minutos a 72 °C, y una segunda de 30 ciclos, 1 minuto a 95 °C, 2 minutos a 50 °C y 2,5 minutos a 72 °C.

30. AISLAMIENTO DEL RNA.

Para obtener el RNA total de un cultivo de *E. coli*, las células se cultivaron en 20 ml del medio de cultivo correspondiente hasta diferentes fases del crecimiento. Unas muestras fueron tomadas en fase exponencial y otras en fase estacionaria de crecimiento, dependiendo del transcrito que se necesitase analizar. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de TE 10:10 (Tri-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 10 mM) lavándolo a continuación con otro ml de TE 10:10. Una vez lavado se resuspendió en 0,4 ml de tampón de lisis (TE 10:10 con 2mg/ml de lisozima (Sigma) y se provocó la lisis celular con tres ciclos sucesivos de congelación-descongelación. Posteriormente, se añadió a la mezcla, SDS al 0,8%, acetato sódico 166 mM, pH 4 y 0,5 ml de fenol ácido equilibrado con agua a 60 °C. La mezcla se calentó a 60 °C durante 5 minutos y se centrifugó a 12.000 rpm 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante recibió un nuevo tratamiento con fenol ácido caliente. El RNA total se precipitó con etanol absoluto disolviéndose finalmente en un volumen adecuado de TE 10:10. La concentración de RNA se estimó a partir de la absorbancia de la preparación a 260 nm. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 40 µg/ml. La cantidad de RNA obtenida a partir de los 20 ml de cultivo de *E. coli* osciló entre 0,3 y 0,8 mg. Para comprobar la calidad del RNA las muestras se visualizaron en un gel de agarosa del 1 %, tras eliminar las RNasas de la cubeta y tampones. Una extracción correcta permite observar bandas de 1,1; 0,8 y 0,2 kb. Los RNAs se conservaron a -70 °C.

Se eliminaron los posibles restos de DNA de la muestra, que pudieran interferir en el análisis posterior del RNA, mediante un tratamiento con DNasa libre de RNasa (DNasa I de Pharmacia) en presencia de RNasina (Boehringer) durante una hora a 37 °C. Posteriormente se procedió a realizar una fenolización ácida y precipitación con etanol del RNA.

31. DETERMINACION DE LOS SITIOS DE INICIACION DE LA TRANSCRIPCION MEDIANTE EL EMPLEO DE LA TECNICA DE EXTENSION CON UN INICIADOR.

Para localizar el sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli* y el de *K. citrophila* se han seguido dos procedimientos diferentes, ambos basados en la técnica de extensión del cDNA a partir de un iniciador o "primer extension" (PEX).

31.1. Método A: marcaje del oligonucleótido con [γ - ^{32}P] ATP.

Para determinar el extremo 5' del mRNA transcrito del gen *pac* de *E. coli* y el de *K. citrophila* se ha empleado el protocolo que describen Maniatis y col. (1982). Se basa en marcar radiactivamente el extremo 5' de 7 pmoles de oligonucleótido con 50 μCi de [γ - ^{32}P] ATP. Posteriormente se emplean 10^6 cpm del oligonucleótido marcado para precipitarlos con el RNA. El oligonucleótido utilizado fue PRS551 (5'-GCCAGGGTTTCCAGTC-3'), que se precipitó con 15 μg de RNA. El precipitado es resuspendido en 30 μl de tampón de hibridación (40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA pH 8, 0,4 M NaCl y 50 % formamida), desnaturalizado con calor a 85 °C durante 10 minutos e incubado 12 horas a 30 °C para conseguir la hibridación. El híbrido RNA-oligonucleótido se precipita con etanol, y el precipitado se resuspende en la mezcla de reacción de la transcriptasa reversa (1x tampón AMV (Promega), 0,9 mM dNTPs, pH neutro, 0,4 U de RNasina, y 3 U de enzima). Se empleó la transcriptasa reversa AMV (avian myeloblastosis virus) de Promega (Reino Unido). La reacción de extensión transcurre durante una hora a 42 °C y se detiene con NaOH a una concentración final de 0,4 M, manteniéndose 12 horas a temperatura ambiente para desnaturalizar los ácidos nucleicos. El siguiente paso fue neutralizar la mezcla con ácido acético 0,4 M y posterior precipitación. El precipitado se resuspende en una disolución 1:1 (v/v) de agua y solución colorante (azul de bromofenol al 0,3 %, xilencianol al 0,3 %, 10 mM EDTA, pH 7,5 y 97,5 % de formamida desionizada). Para analizar la longitud de los productos de la extensión, y por tanto, el punto de iniciación de la transcripción, se realizó una electroforesis cargando las muestras en un gel de poli(acrilamida) al 6 %-urea 8 M y detectándose el resultado por autorradiografía. La secuenciación de los plásmidos que contenían las zonas promotoras subclonadas, con el mismo oligonucleótido, sirvió para localizar el punto de iniciación de la transcripción en el genoma.

31.2. Método B: incorporación de [α - ^{32}P] dCTP.

Este método se basa en el ensayo que utilizaron Chandry y col. (1994). En este caso el oligonucleótido empleado para analizar el extremo 5' del mRNA del gen *pac* tanto de *E. coli* como de *K. citrophila* fue el siguiente: 5'-GCTCCAATAATACATCAGGGAAG-3'. Se utilizan 0,25 μg de oligonucleótido y 15 μg de RNA para realizar el anillamiento en 3 μl a 90 °C durante un minuto y, a continuación, 5 minutos a 42 °C. El cDNA es sintetizado en un volumen de reacción de 10 μl que contiene 24 U de la enzima transcriptasa reversa (AMV), 15 μCi [α - ^{32}P] dCTP, dCTP 10 μM , dATP 100 μM , dGTP 100 μM , dTTP 100 μM , Tris-HCl 50 mM pH 8,5, KCl 50 mM, MgCl_2 20 mM y DTT 10 mM. La reacción se incubó a 42 °C 30 minutos y se para con 5 μl de 0,5 % formamida, EDTA 20 mM, 0,05 % azul de

bromofenol y 0,05 % xilencianol. El resultado se visualiza y analiza como en el método anterior.

Este método es mucho más rápido que el anterior y tiene la ventaja de conseguir una mejor desnaturalización cuando se trabaja con material genético de elevado contenido en estructura secundaria.

RESULTADOS

1. MODIFICACION DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA PGA.

1.1 DISEÑO DE MUTANTES.

Aunque la especificidad de sustrato y el mecanismo cinético de la PGA ha sido estudiado bajo diferentes enfoques, las bases moleculares de la unión del sustrato y la catálisis, así como la estructura tridimensional de la enzima, no eran conocidas al inicio de este trabajo. Por este motivo, el diseño de las proteínas mutantes tuvo que realizarse en base a evidencias indirectas sobre su estructura o función.

1.1.1. Comparación de secuencias de BLA.

Con objeto de alterar la especificidad de sustrato de la PGA de *K. citrophila* y poder diseñar enzimas con nuevas propiedades catalíticas o mejorar las existentes se ha recurrido a la ingeniería de proteínas como herramienta de trabajo. Dado que las secuencias de los genes que codifican varias BLA han mostrado un grado de similitud significativa (Virden, 1990), un análisis comparativo con todas las secuencias de BLA descritas podría sugerir residuos potencialmente interesantes para ser mutagenizados. Un alineamiento de las mismas (figura 6) reveló un porcentaje de similitud de secuencia entre las PGA superior al 45%, mientras que la similitud existente entre las PGA y las GLA fue menor del 35%. El porcentaje de similitud encontrado entre las GLA fue de este mismo orden. Las regiones con mayor grado de conservación en la mayoría de las secuencias comparadas podrían ser zonas estructural o funcionalmente esenciales. Esto vendría apoyado por su estructura heterodimérica común (tabla 6), y por tanto, serían candidatas de interés para ser alteradas por mutagénesis. La región que presentó un mayor grado de similitud entre todas las secuencias comparadas, comprendía desde el residuo de Arg37 hasta el de Ser75 de la subunidad α , refiriendo la numeración a la secuencia de la PGA de *K. citrophila*.

Estudios previos han localizado residuos responsables de la interacción de la PGA con el sustrato en la subunidad α (Williams y Zuzel, 1985; Prieto y col. 1990). Oliver y col. (1985) han propuesto una semejanza estructural entre una región de la subunidad α de la PGA de *E. coli*, que incluye la Met168 (figura 2), y un dominio de las PBPs de *E. coli* situado en torno a la serina catalítica, que estaría implicado en la unión del sustrato. Por otro lado, la mutación Val62Leu, situada en esta región de alta similitud, fue responsable de un cambio de especificidad de sustrato de la GLA de *Pseudomonas* sp. GK16 (Matsuda y Komatsu, 1985; Quax y col. 1991). Este conjunto de datos son indicativos de la importancia que parece tener la subunidad α en la unión del sustrato. Dado que la región más conservada entre las BLA, contiene el residuo Val62 mencionado anteriormente, se seleccionó dicha región para comenzar el proceso de mutagénesis y tratar de esclarecer las bases moleculares de la unión del sustrato.

1 MKFIKSFILVTFSPFCMITPAFASVPGV-----DKSMGRGATKGIVSVSHPL-AAEAGIKILK-QGGNAVDAAAAIQLSLNVVEPH-MSGIGGG
2 MNAPVPPVRVADFTC-----EKKPASGS-RGMVVTNHPL-ASAAGAQILL-AGGNDAVAVASLFALTVAEPM-MVGILGG
3 MTMAANTDRAVLQA-----ALPPLSGS-LPIPLGSASVRVRDAGWIPHIKASGEADAYRALGFVHSDRLFQMELTRRK
4 MTMAANTDRAALQA-----ALPPLSGS-LPIPLGSASVRVRDAGWIPHIKASGEADAYRALGFVHAQDRLFQMELTRRK
5 MTNAAKTDREALQA-----ALPPLSGS-LPIPLGSASVRVRDAGWIPHIKASGEADAYRALGFVHAQDRLFQMELTRRK
6 MKNRNRMI VNGI VTSLICSSLSALA-----ASPPTS-----V---K-----IVRDEYGMPIYADDTYRLFYGYGVVVAQDRLFQMEMARRS
7 MQKGLVRTGLVAAGLILGWAGAPTHA-----QVQSVE-----V---M-----RDSYGVPHVFDASHYGLYYGYGYVAVQDRLFQMEMARRS
8 MKNRNRMI VNCVTASL MYVWSLPALA-----EQSSSE-----I---K-----IVRDEYGMPIYANDTWHLFYGYGVVVAQDRLFQMEMARRS
9 MKKHLISIAIVLSLSLSLSSFSQST-----QIKIE-----RDNYGVPHIYANDTYSLFYGYGYVAVQDRLFQMEMARRS
10 MKMKWLISVILFVFIFFQNLVFAE-----DKNEG-----V---K-----VVRDNFGVPHLYAKNKDLYEAYGYVMKDRLFQLEMFRRG
11 MKTKWLISVILFVFIFFQNLVFAE-----DKNEG-----V---K-----VVRDNFGVPHLYAKNKDLYEAYGYVMKDRLFQLEMFRRG
12 MLRVLHRAASALVMATVIGLAPAVAFALA-----EPTSTPQA-PIAAYKPRSNEILWDGYGVPHIYGVDPASAFYGYGNAQARS HGDNILRLYGE
13 MQRPNATYAIHAIGALACAFATWSASVHA-ADTAPSATPPSSQTLTVAGLSQPADILDRNGVPHIFAQERDQFFVQGNNAARDRLFQIDLWRRR

1 GFIMI--YNNKENKITMLDS---RMAPENVTPELF--L--DGKGPPIPFSCR-HTTG-KAVGVPGTLKGVEALEKY--GTLDISQVIDPAIK
2 GLSHIRLADGR---HVVIDN---LSTAPGKATAEMEYCL-SDEIGKQDRDTRDRQNVVGA KAVAVTGALKGWCDALARF---GTLPLADVLQPAIG
3 ALGRAAEWLGAEEAEADILV---RRLGMEKVCRRDFEAL-GVEA-KDMLLRAYVAGVNAFLASGAPLPVEYGLL-----GAEPPEPWPWHSTIA
4 ALGRAAEWLGAEEAEADILV---RRLGMEKVCRRDFEAL-GAEA-KDMLLRAYVAGVNAFLASGAPLPVEYGLL-----GAEPPEPWPWHSTIA
5 ALGRAAEWLGAEEAEADILV---RRLGMEKVCRRDFEAL-GAEA-KDMLLRAYVAGVNAFLASGAPLPVEYGLL-----GAEPPEPWPWHSTIA
6 TQGTVSEVLGKAFVSFDKDI---RQNIWPD SI RAQIASL-SAE-DKSI-LQGYADGMNAWIDKV-NASPDK-LLPQQPSTGTFKPKHWPFDVAM
7 FVGTAAVLGPGEQDAYVKYDMQVRQNFTPASIQRIAL-SKDE-RDI-FRGYADGYNAYLEQV-RRRPE---LLPKEYVDFDQPEPLTOFDVVM
8 TQGTVAEVLGKDFVKDKDI---RNNYWPDAIRAQIAAL-SPED-MSI-LQGYADGMNAWIDKV-NTNPEF-LLPKQFNTFGFTPKRWEPFDVAM
9 TQGTVSEVFGKDYISFDKEI---RNNYWPDSIHKQINQL-PSQE-QDI-LRGYADGMNAWIKQI-NTKPD-LMPKQFIDYDFLPSQWTSFDVAM
10 NEGTVSEIFGEDYLSKDEQS---RRDGYSNKEIKKMIDG-LDRQ-PRE-LIAKFAEGISRYVNEALKD PDD-KLSKEFHEYQFLPQKWTSTOVVR
11 NEGTVSEIFGEDYLSKDEQS---RRDGYSNKEIKKMIDG-LDRQ-PKE-LIAKFAEGISRYVNEALKD PDD-KLSKEFHEYQFLPQKWTSTOVVR
12 ARGKGAEYWGPDVEQTTVWL---LTNGVPE--RAQQWYAAQSPDFR-ANLNAFAAGINAY---AQQNPD-ISPVRQVLVPSGADVVHRLIM
13 GLGELSEVRGRAYVAQDDAA---RR-FVYRGDMATQW-RRYGPDAKPAA-EASAAGVNAIYEWLAA-HPDQ-MPYEFTV-GYPAKWTPEIDIVR

1 QAEK-GVKVNWITAQYIDENVKKLQNNQAAANVFP---NG---QPL-----KE--GDTLVQPDL--AKTLKLKIKQG-S--EVFYSQIQKA
2 LAER-GFVVTPLYSNICITONAGDLARDPQLAAMLLP---GG---KPL-----QP--GMRLVQSDY--AASLKLIAAEG-P--DALYGGKLGRA
3 VMRLGLLMSVWFKLWRMLALPVVGAANALKLRYD--DGG---RDL--L---CIPP--GA-EAD---RLEADL---ATLR-PAVDALLKAM---
4 VMRLGLLMSVWFKLWRMLALPVVGAANALKLRYD--DGG---RDL--L---CIPP--GA-EAD---RLEADL---ATLR-PAVDALLKAM---
5 VMRLGLLMSVWFKLWRMLALPVVGAANALKLRYD--DGG---QDL--L---CIPP--GV-EAE---RLEADL---AALR-PAVDALLKAM---
6 IFVGTMANRFS DSTSEIDNLAL---LTAVKDKYGNDEGMVFNQLKWLNVNSAPTITIAARESSYPLKFDLQNTQTALLVPRYDQAPMILDRPA
7 IFVGTMANRFS DSTSEIDNLAL---RQSLKQHGPERGRALFDELLWINDTTAPTTPAPAAEHKQQAQAGTQDLAHVSSPVLA TELERQDKHW
8 IFVGTMANRFS DSTSEIDNLAL---LTALDKKYGVSGQMAVFNQLKWLNVNSAPTITIAVQESNYPLKFNQNSQTAAAL-PRYDLAPMILDRPA
9 IFVGTMANRFS DSTSEIDNLAL---LTALDKKYGEQLGVEFFNQINWLNPNAPTITISSEFTYSDSQKTKNISQLNQI-SDYRLTAPMFERTA
10 VYVMSMTYWLIIITRELKNAEIL---AKLEHEYGTVEVRKMFDDLWVKNPDSAPTSIVSR-----GKPKRDSSSQ-----
11 VYVMSMTYFMDNHQELKNAEIL---AKLEHEYGTVEVRKMFDDLWVKNPDSAPTSIVSE-----GKPKRDSSSQ-----
12 NFL-YVAS-PGRITLGED---PPD-----LADQ-G-----
13 IRSHGLTRNLKSEVARAKVCKASLDADSVRVLQPAWKTQVPAGLDPLCPDLDLLKVFDLATQGVKITKESLQRADADIQVAEAGFYDVSTESAE

1 L-TKEV-QKREGTMTTDLNENYVVKEREPIRSEYRGYELAGASFSGSLTVQQILEMGEFVQKMGANSPEYLHYLTEAMHLAFADRAAYMADE
2 L-TOYM-AANGGLIDEADLANRYIELRETIRGYSYRGYEXIGPPPPSSSGVHITQMLNILEGYDYGSLGFGSTDAVHLLAEALKIAFADRAVATADP
3 -GGDASDAAGGG-----
4 -GGDASDAAGGG-----
5 -GGDASDAAGGG-----
6 KGTDGALLAVTAIKNRETIAAQFANG-ANGLAGYPTT
7 -GGRQDFEAPKA-----
8 KGADGALLALTAGKNRETIVAQAQGGANGLAGYPTT
9 KDTTGKVLALSSQENNALIAKQYEQSGANGLAGYPTT
10 SLQKLSSAVIKASEKVGERENFVQSSEELGLPLKIG
11 SLQKLSSAVIKASEKVGERENFVQTSEELGLPLKIG
12 -G-----

1 DFYDVPTKGLLDEDDYIKERRKIINPNRSTADVKEGDPWKYEGTEPTSMKKVKEKTPIGQ
2 AFVKVPVARLIDKAYDERRALIEMEQAKSWTAGLSGSESAD-----

1 TTHFSVMDKWMVMVAYTTTIEQVFGSGIMVPDYGFMRNNEMTDFDAPGQVNVQVEPGKRPR-SSMSPTFVLKDGNNPMAIGSPGGASIIASVSETI
2 TTHVTVADAMGNVVSATQTINGLFGACVQIPGTGMIANNMYNFDPHPRALSTAPQKRVF-TSMAPMMALKEGRIFAFALGLPGALRIFPSALQAI
3 SNNWAVAPGRATGRPILAGDPHRVFEIPGM-YAQHHLACDRFDMIGLTPGVPGQFP-HFAHNGKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQF-AG-EGRTARF
4 SNNWAVAPGRATGRPILAGDPHRVFEIPGM-YAQHHLACDRFDMIGLTPGVPGQFP-HFAHNGKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQF-AE-EGRTARF
5 SNNWAVAPGRATGRPILAGDPHRVFEIPGM-YAQHHLACDRFDMIGLTPGVPGQFP-HFAHNGKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQF-AE-DGRTARF
6 SNNWVIGKKAQDAKAIMVNGPQFGWYAPAYTY-GIGLHGAGYDVTGNTFFAYPGLV-FGHNGTISWGSTAGFODDVIDFAEKLSAEKPYYQH
7 SNLWSTRPERVQEGSTVLINGPQFGWYNPAYTY-GIGLHGAGFDVVGNTFFAYPIVL-FGTNSEIANGATAGPQDVVDIYQKLMPSRADQYWFN
8 SNNWVIGKSKAQDAKAIMVNGPQFGWYAPAYTY-GIGLHGAGYDVTGNTFFAYPGLV-FGHNGTISWGSTAGFODDVIDFAEKLSAEKPYYLHN
9 SNNWLVGKTKASGAKAILLNGPQFGWYNPAYTY-GIGLHGAGFNIVGNTFFAYPAIL-FGHNGHVSWGSTAGFGDVIDFAEQVSPEDPNSYLHQ
10 SNAAIIVGSEKSATGNALLFGSPQVGFVAPGFLY-EVGLHAPGFDMEGSGFIGYPFIM-FGANNHFALSATAGYGNVTDIFEEKLNKNSSQVLYK
11 SNAAIIVGSEKSATGNALLFGSPQVGFVAPGFLY-EVGLHAPGFDMEGSGFIGYPFIM-FGANNHFALSATAGYGNVTDIFEEKLNKNSSQVLYK
12 SNNWAVAPGKTANGNALLQNPILSWTTDYFTYEAHLVTPDFEYIGATQIGLP-V-IRFAFNQRMGITNTVNGHVGATNYRLTL-Q-DGGVLYD
13 SNNW-ISPQXSATGRAIMANDPHRAYAAPSALYIVQVSTPTL-KLIGAGEPAIPGVAIGHNGT-IAFGLTIFNIDQEDLYVYELNPNPQVRYR

1 MNVLDHQMLIQDAILAPRIYSAGYPTV----RWEFGIEQNTIGELMGKHVYEEKPQHIGNVGAVIFDYEGKMGYGGADNTREGTVQGVNVSYK
2 VNLIDHRMSLQEAVEAPRVVTEGGVLE----LEEAIPE-AVAQALIARGHKVVRSPRVAGGMNALAFNPD-GTLTGAACWRADGTPVAISGGLAR
3 GNDPEPVAWSR-DRIAVR-GGAD-REFD-IV-ETRHGPVIAGDPRDGAALTLRSVQFAETDLSFDCLTRMPGASTVAQLYDATRGWGLIDHNLVAG
4 GNDPEPAWSR-DRIAVR-GGAD-REFD-II-ETRHGPVIAGDPRDGAALTLRSVQFAETDLSFDCLTRMPGASTVAQLYDATRGWGLIDHNLVAG
5 GNEFEPVAWSR-DRIAVR-GGAD-REFD-IV-ETRHGPVIAGDPRDGAALTLRSVQFAETDLSFDCLTRMPGASTVAQLYDATRGWGLIDHNLVAG
6 G-KWVQMLSRK-ETIAVKDQGP--ETFT-VW-RTVHGNVKTDTTRQTAYAKARAWDGKEVASLLAWTHQMKAKNPEWTOQAQKQALTNWYYA-
7 N-AWRTNEQRK-ERIQVR-GQAD-REMT-IW-RTVHGPVMKFDYDQGAAYSKKRSWDGVEVQSLAWLNVAKARNWTEFLDQASKMAISINWYYA-
8 G-KWVKMLSR-ETITVKNGQA--ETFT-VW-RTVHGNILQTDQTTQTAYAKSRAWDGKEVASLLAWTHQMKAKNPEWTOQAQKQALTNWYYA-
9 G-QWKKMLSRQ-ETLNVKGEQP--ITFE-IY-RTVHGNVVKRDKTHTTAYS KARAWDGKELTSLMAWVKQGGQANWQQWLDQAGNQNALTNWYYA-
10 G-KWRDMKKR-ESFTVKGDNGEKKTVKIIYRTVHGPVISRDETNKVAYSKYVSFRGTEAQSMASMYKANAKNLKEFENAASEYTMSLNWYYA-
11 G-KWRDMKKR-ESFTVKGDNGEKKTVKIIYRTVHGPVISRDETNKVAYSKWSFRGTEAQSMASMYKANAKNLKEFENAASEYTMSLNWYYA-
12 GQVRPFERRQASR--LRQADGTTVDKPLEIRSSVHGPPV-FERADGTAVAVR VAGLDRPGMLEQYFDMIT-A-DSFDDYEALARMQVPTFNIVYA
13 G---KWVSMRTA-HETINVRDQAPVETDLK--FTRHGPVIVYDQKQPRVCRAGHMARTGHVALLRRHALHAREELREFQKALDTWGAFTVQVYA

1 SKKPKEIKEKKQPTFLKVGAVYPTAEQMKLINEKPYIQSKLLLSGLVIGTQDLETFRPDKKSYLPVIVKVAKSLGYKAKWNEKDKEALLEKDP
2 AGARFTI-----
3 DVAGSIGHLVRARVPSRPRENGW--LPVPGWSGEHEWRGWPHEAMPVIDPPGGIIVTANNRVVADHDHLYCTDCHPPYR--AERINK--RLV
4 DVAGSIGHLVRARVPSRPRENGW--LPVPGWSGEHEWRGWPHEAMPVIDPPGGIIVTANNRVVADHDHLYCTDCHPPYR--AERINK--RLV
5 DVAGSIGHLVRARVPSRPRENGW--LPVPGWSGEHEWRGWPHEAMPVIDPPGGIIVTANNRVVADHDHLYCTDCHPPYR--AERINE--RLV
6 DVNGNIGYVHTGAYPDRQPHDP--RLPVP-GTKWDWKGLSLFOLNPKVYNPQSGYI--AN--WNNSPQKDYPSDLFAFLNGADRVTEIDTYL
7 DKHGNIGYVSPAPLQRPADQI--RVPAGG-DGSNEWLGIKSFDALPKAYNPQGYL--VN--WNNKPAPDKNTIDTYVYTWG--DRNNELVSQY
8 DVNGNIGYVHTGAYPDRQSGHDP--RLPVP-GTKWDWKGLSLPFEMNPKVYNPQSGYI--AN--WNNSPQKDYPSDLFAFLNGADRVTEIDRL
9 DKDGNIYVHTGHYPDRQINHP--RLPVP-GTEWDWKGIQPFANPKVYNPKSGYI--AN--WNNSPAKNYPSDLFAFLNGSADRVKEIDNRI
10 DKKGDIAYYHVGRYPVRNKIDE--RIPTPG-TGEYEWKGFIPFKENPHVINPKNGYV--VN--WNNKPSKEWNGEYSYVWGEDNRVQYI-NGM
11 DKKGDIAYYHVGRYPVRNKIDE--RIPTPG-TGEYEWKGFIPFKENPHVINPKNGYV--VN--WNNKPSKEWNGEYSYVWGEDNRVQYI-NGM
12 DREGTINYSFNGVAPKRAEGDIAFVQGLVPGDSSRYLWTEHPLDLPVNTNPGGFVQNSNDPPTPTWPTVYTPKDFPSYLAQ-QTPHSLRAQ
13 DTAGNIGWVPSGMAPIRPNWDGI--MPVPGD-GRYEWAGFWRRDQLPSAYNPATQYFTTSNEMMMPAGYVDDQKRLGFEWNTGS-RHARIDEVLK

1 ADIEDPEDDGSVTIIFHSKFKFHMVDNLRDEEFVIVVLTLNEC-----
3 AN-PAPAVDDAAAIHADTLSPH--VGLLRRRLEA-L-----GARDDSAAGLRQMLVANDGRMDAASAVASA-YNAFRRALTRLVTRSGLEQ
4 AN-PAPAVDDAAAIHADTLSPH--VGLLRRRLEA-L-----GARDDSAAGLRQMLVANDGRMDAASAVASA-YNAFRRALTRLVTRSGLEQ
5 AS-PAPAVDDAAAIHADTLSPH--VGLLRRRLEA-L-----GIQGSIPAEEELRQTLIANDGRMDAGSQAASA-YNAFRRALTRLVTRSGLEQ
6 DKQPRFTADQAWDVIRQTSRLD--L--LRLFLPA-L-KDA-T-ANLAENDPRRLQVLDKASWDGENLVNDGKTY-QQPGSAILNWL--SML--
7 QKDLFSVQYEWFEFNQKASYSD--VN-WRYFRPH-L-EKL-A-QQLPADDSKKAALTMLLAWDGME--QDQGGQ-AGPARVLFKWTLE--EMY--
8 EQKPRLTADQAWDVIRQTSRLD--LN-LRLFLPT-L-QAA-T-SGLTQSDPRRLQVETLTRWDGINLLNDGKTY-QQPGSAILNWL--SML--
9 EAYDKLTADDMAILQQTSRVD--LN-HRLFTPF-L-TQA-T-QGLPSNDNSVKLVSMQLQNDGINQLSSDGKHY-IHPGSAILDWL--EML--
10 EARGKVTLEDINEINYTASFAQ--LR-ANLFKPL-L-IDV-LDKNKSTNGNYTYLIEKLEWNNLKEDENKGGY-DAGIAAFFDEWNN--NLH--
11 EARGKVTLEDINEINYTASFAQ--LR-ANLFKPL-L-IDV-LDKNKSTNGNYTYLIEKLEWNNLKEDENKGGY-DAGIAAFFDEWNN--NLH--
12 SV-RLMSENDLTLERFMAQL----SHRAVMADRTLPLIPALIDPDEVQAAARLLAAWDREFTSDSRAALLFEWARFLAGQNFAGQAGFAT
13 AK-DKVSIEDSERLQNDIVSIP-----ARRLMA-L---LAPL-NSDDPQTAALKLLKQWDAKMDASQAALAEVWFSRHLGRAYK-NAVLPK

3 AISHPFAAVAPGVSPQGGVWVAVPTLLRDDDA-GMLKGWSWDQALSEALSVAQN-LTGRSWGEEHRRPFTHTPLATQFPWAGL---LNPAS--R
4 AISHPFAAVAPGVSPQGGVWVAVPTLLRDDDA-GMLKGWSWDQALSEALSVAQN-LTGRSWGEEHRRPFTHTPLATQFPWAGL---LNPAS--R
5 AIAHPFAAVPPGVSPQGGVWVAVPTLLRDDDA-GMLKGWSWDEALSEALSVAQN-LTGRSWGEEHRRPFTHTPLAQFPWAAAL---LNPVS--R
6 -KRTVVAAPVAPFGKWSASGYETT--QDGP-T-GSLNISVGAKILYEALQGDKSP-IPQAVDLFGGKPEQEVILAALDDAWETLSKRYGNDVT-GW
7 -KQVLMPPVVPESHAMYSQTGF-AT--QGGPNPGSINLSMGTKVLRLALVLEAHP-DPKRVNVFGERSSQEIMHTALQNAQARLSQEQGAQMA-RW
8 -KRTVVAAPVMPFDPKWSASGYETT--QDGP-T-GSLNISVGAKILYEALQGDKSP-IPQAVDLFAGKPPQEVVLAALDDAWETLSKRYGNVNS-NW
9 -KATLGQTVAPFDPKWSASGYETT--QEGPT-GSLNISVGAKILYEALQEDKSP-ISQSIDLFGGQPNQNDVIRKTLNTTYQKMKIEKYGNPA-NW
10 DK--LFMDLGDYFG-----IT--KE-IT---DHRYGASLAYKNISKESTN-----YKWNVDQEKIIMESTNEVLAKIQSEKGLKAE-KW
11 DK--LFMDLGDYFG-----IT--KE-IT---DHRYGASLAYKILNKESTN-----YKWNVDQEKIIMESTNEVLAKIQSEKGLKAE-KW
12 PSLDKPVSTPYGVDRPKAAVDQLRTALANLTKRKYGAIDRPFQDASRMILNDVNVPGAAGYGNLGSFRVFTTSDPDENGVRTPVHGETWVANIEF
13 GAADSPGAPDPAHMLDALEQPAARFGENAN-AKRDAVVLSSSLGANGEMVKLKGAD-PGAWKWKGLQTNLAHPLATRRPGHAREAQRRS-VAQ-QR

3 PIGGDDGTVLANG--LVPSAGPQ-----ATY---GALS-RYVFDVGNWNSR---W-VV-FHGASG--HPASA---HYADQN-APWSDCANVPML
4 PIGGDDGTVLANG--LVPSAGPQ-----ATY---GALS-RYVFDVGNWNSR---W-VV-FHGASG--HPASA---HYADQN-APWSDCANVPML
5 PIGGDDGTVLANG--LVPSAGPQ-----ATY---GALS-RYVFDVGNWNSR---W-VV-FHGASG--HPASA---HYADQN-APWSDCANVPML
6 KTPAMALTFRANFFGVPAQAAKEARH-QAEYQNRGTENDMIVFSPSTSGNRPVL-AWDVV-APQSGFIAPDGKADKHEDQL-KMYESFGKRS-L
7 TMPTSVHRESKDNFTGTPTMGNTFA-FTGYQNRGTENNRRVVF---DAKGV-EFCDAM-PPQSGFDTRNGVRSPHYEDQL-KLYENFECKTMD
8 KTPAMALTFRANFFGVPAQAAEETH-QAEYQNRGTENDMIVFSPSTSDRPVL-AWDVV-APQSGFIAPDGTVDKHYEDQL-KMYENFGKRS-L
9 QTPATALTFRANFFGVPAQALPQENFH-QNEVHNRGTENDLIVF---TEEGVS-AWDVV-APQSGFISPPQKPSPHYQDQL-SLYQQFGKKP-L
10 RMPKMTTFGEKSLIGIPH---GYGSMTPIIEMNRGSENHYIEM---TPKQPS-GFNIT-PPQIGFVKKDGTTISDHYDDQL-VMFAEWKFKP--
11 RMPKMTTFGEKSLIGIPH---GYGSMTPIIEMNRGSENHYIEM---TPTQPS-GFNIT-PPQIGFVKKDGTTISDHYDDQL-VMFAEWKFKP--
12 STPVRAVGLMSYGNRQPGTTHY-----SDQI--ERVS-----RADFRELL---RREQVE--AAVQE--RTPFNF-QP-----
13 QCLYAEFPVLSRER-LPPDQRAV-----VPDR--GRCG---QLQKHARDEPAG-----RIQSGG--QPALS---RTCAEV-GSTASTSSAVHP

3 YSW-DRIAAEAV-TSQE--L--VPA
4 YSW-DRIAAEAV-TSQE--L--VPA
5 YSW-DRIAAEAV-TSQE--L--VPA
6 --WLTQDVDEHESQE-VL-QVQR
7 VTH---ADYRRNAQSSTMLLIQPP
8 --WLTQDVDEHESQE-VL-HVQR
9 --WLNSEDVAPYIESTE-TL-IER
10 --YLFNKKD IYKAATNVSAL-NMSK
11 --YLFNKKDINKAAGNVSAL-NMSK
13 --CRRRSRDGVAPASGAGGVALM--

Figura 6. Comparación de secuencias de las subunidades α y β de las β -lactam acilasas. (1) CFA de *B. megaterium* ATCC 53667 (Rambosek y col. 1990); (2) GLA (acyI) de *Pseudomonas* SE83 (Matsuda y col. 1987b); (3) GLA de *Pseudomonas* sp. N176 (Aramori y col. 1991b); (4) GLA de *Pseudomonas* sp. V22 (Ishiye y col. 1992); (5) GLA (acyII) de *Pseudomonas* SE83 (Matsuda y col. 1987b); (6) PGA de *K. citrophila* ATCC 21285 (Barbero y col. 1986); (7) PGA de *A. faecalis* ATCC 19018 (Quax y col. 1991); (8) PGA de *E. coli* ATCC 11105 (Schumacher y col. 1986); (9) PGA de *P. rettgeri* ATCC 31052 (Daumy y col. 1986); (10) PGA de *A. viscosus* 8895GU (Ohashi y col. 1988); (11) PGA de *B. megaterium* ATCC 14945 (Martín y col. 1995); (12) GLA de *Pseudomonas* sp. GK16 (Matsuda y col. 1985); (13) GLA de *Pseudomonas* sp. A14 (Aramori y col. 1991b). Las secuencias de las otras dos BLA conocidas de *B. laterosporus* (GLA) (Aramori y col. 1991a) y *B. sphaericus* (PVA) (Olsson y col. 1985) no se han incluido en esta comparación, ya que no presentan similitud con las anteriores.

1.2. ESTUDIOS DE MODIFICACION DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO POR MUTAGENESIS DIRIGIDA.

Debido a la falta de datos cristalográficos que pudieran indicar de forma más precisa los residuos implicados en la unión de un determinado sustrato, se optó por mutagenizar al azar los residuos comprendidos en una determinada zona de la secuencia de la PGA de *K. citrophila* (residuos Arg37-Ser75) conservada en muchas BLA, aunque principalmente en las PGA. Por razones técnicas (disposición de cortes de restricción adecuados, hibridación de oligonucleótidos, etc.) se estudió la zona Pro43-Met71 mediante mutagénesis al azar con PCR de baja fidelidad, y la zona Pro43-Tyr51 cuando se utilizó PCR con un iniciador degenerado. La estrategia seguida consistió básicamente en la creación de dos genotecas como se muestra en la figura 7, con las que se transformó la cepa de *E. coli* HB101 para seleccionar aquellos clones capaces de crecer en los medios selectivos de interés, y posteriormente localizar la/s mutación/es responsable/s.

Este procedimiento de presión selectiva para el aislamiento de mutantes con nuevas especificidades de sustrato ha sido utilizado previamente (Vandamme y Voets, 1974; Daumy y col. 1985; García y Buesa, 1986; Quax y col., 1991). La idea fundamental de este método radica en que la cepa de *E. coli* HB101 es auxótrofa para L-leucina y debe conseguir el aminoácido por medio de la hidrólisis de un acil derivado del mismo. Con el fin de encontrar clones que hubieran desarrollado estas actividades enzimáticas, se utilizaron para la selección medios mínimos con varios acil derivados: glutaril-L-Leu, adipil-L-Leu y amino adipil-L-Leu. La selección se realizó en paralelo con fenilacetil-L-Leu para detectar mutantes que mantuvieran la actividad enzimática sobre su sustrato original aunque con variaciones en sus constantes de especificidad.

1.2.1. Mutagénesis al azar mediante PCR.

Uno de los métodos más utilizados para producir mutagénesis al azar se basa en el empleo de la técnica de PCR en condiciones donde la fidelidad de la actividad enzimática de la *Taq* DNA polimerasa esté desfavorecida. Esto se consigue incrementando las concentraciones de los iones Mn^{2+} y Mg^{2+} , así como variando la concentración relativa entre los diferentes dNTPs (Leung y col., 1989).

Utilizando este método se amplificó el fragmento de DNA de 165 pb, que codificaba la zona Pro43-Met71. Este fragmento fue purificado mediante Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (Promega) y posteriormente digerido con las enzimas de restricción *BbuI* y *AscI* (figura 7). El fragmento digerido se ligó al vector pYKD60, que previamente se había digerido con las mismas enzimas de restricción, y se había purificado por GeneClean (Bio101).

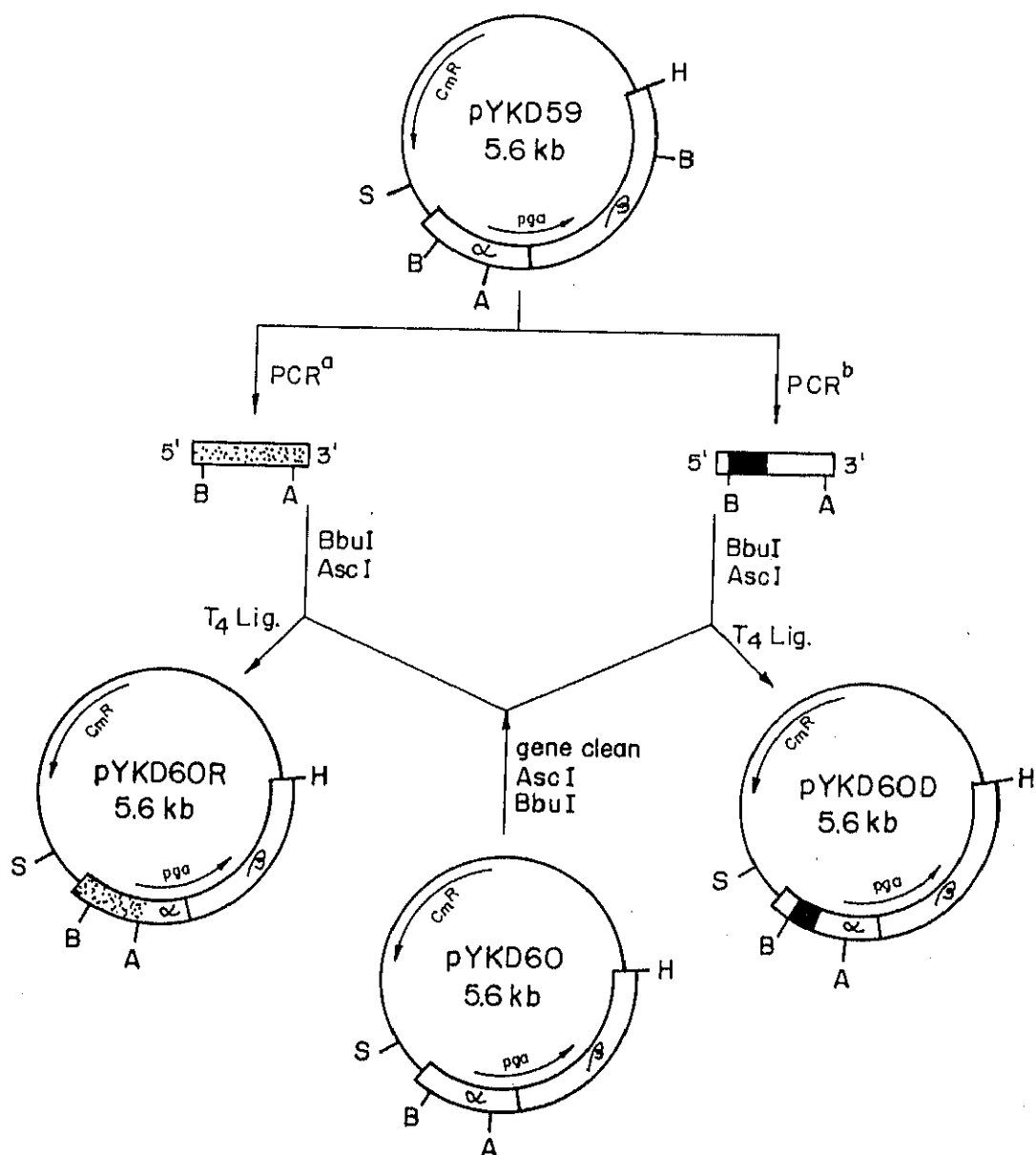


Figura 7. Construcción de los plásmidos pYKD60R y pYKD60D. Estos plásmidos fueron utilizados para transformar la cepa de *E. coli* HB101 y crear dos genotecas, con el objeto de seleccionar y poder caracterizar clones que presentaran nuevas especificidades de sustrato. Los plásmidos vienen representados por círculos, se muestran los elementos relevantes y los sitios de restricción. La línea gruesa indica el vector y las cajas blancas muestran el gen *pac* (*pga*) nativo. El punteado o sombreado dentro de la caja α , señala la zona con las mutaciones introducidas mediante PCR. PCR^a, PCR de baja fidelidad; PCR^b, PCR empleando un iniciador degenerado. Las direcciones de transcripción de los genes se indican con una flecha. Abreviaturas: A, *AscI*; B, *BbuI*; *Cm^R*, resistencia a cloranfenicol; H, *HindIII*; S, *Scal*; T4 Lig., DNA ligasa de T4. α y β representan las subunidades α y β de la PGA nativa; α' , representa la subunidad α mutagenizada.

Este vector procede del plásmido pYKD59 (Prieto y col. 1990) que, tras haber sido sometido a un proceso de mutagénesis dirigida, ha perdido una segunda diana *Bbu*I. El producto de la ligación sirvió para construir una genoteca con la construcción pYKD60R. Posteriormente se transformó *E. coli* HB101, que se cultivó durante 24 horas a 37°C en LB en presencia de cloranfenicol (Cm), guardándose a -80 °C en glicerol al 15 % (v/v). Los transformantes se analizaron plaqueándolos sobre los medios selectivos mencionados anteriormente. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas. En paralelo se utilizaron placas de medio rico LB para analizar los transformantes de manera aleatoria y comprobar que las construcciones eran correctas.

No se obtuvieron clones que hubieran desarrollado la capacidad de hidrolizar adipil-, aminoadipil- o glutaril-L-Leu. Sólo se obtuvieron clones capaces de crecer en las placas que contenían fenilacetil-L-Leu como sustrato, que fueron ensayados por su eficiencia catalítica respecto de un control de PGA nativa. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo cultivando los clones en placas de ELISA de 96 pocillos (con 200 µl por pocillo) y utilizando como sustratos NIPAB y penicilina G. La posibilidad de encontrar artefactos utilizando este tipo de ensayo resulta elevada, por lo que se trataron de confirmar los resultados, repitiendo los cultivos seleccionados en volúmenes de 1 ml. En total fueron analizados 380 clones, de los cuales un 10 % presentó una alteración de aproximadamente un 20 % en su actividad catalítica respecto del control. Con objeto de validar el método de selección, cuatro de estos clones fueron seleccionados y se secuenciaron las regiones de DNA que habían sido amplificadas mediante PCR de baja fidelidad. Todas las secuencias resultaron ser iguales a la secuencia nativa de la PGA.

Aparentemente este tipo de ensayo con células enteras sólo permite discriminar la presencia de mutantes con una actividad algo más alterada. Así por ejemplo, el clon HB101(pYKD60R19) presentó una pérdida de actividad de un 35 % sobre penicilina G respecto del control, aunque se mantuvo sobre NIPAB. Su secuenciación reveló la presencia de dos transversiones, en la posición 231 (A/G) y en la posición 260 (T/C), que se traducían en sendos cambios, Asp49Gly y Tyr59His. Para analizar si el cambio de actividad observado podría deberse a una implicación directa de estos residuos en la unión del sustrato, o bien a una alteración estructural, se realizó un estudio de predicción de estructura secundaria de la región amplificada por PCR (figura 8). Esta aproximación se realizó puesto que aún no estaba determinada la estructura tridimensional de la PGA. La predicción indicó que el Asp49 se localizaría en una zona de giros-β y, por tanto, el cambio Asp49Gly no debería representar una gran alteración estructural. Ahora bien, tal reemplazamiento supone la pérdida de una carga negativa y no se puede descartar la posibilidad de una alteración en la estructura de la proteína. En cuanto a la Tyr59, también estaría situada en una zona de giros β, y su sustitución por una histidina, tampoco debería suponer un cambio estructural significativo.

En base a la estructura tridimensional determinada recientemente (Duggleby y col. 1995), se podrá conocer el papel que desempeñan estos residuos dentro de la PGA.

49 59
 | |
 ASPPTEVKIVRDEYGMPhiYADDTYRIFYGyGVVAQDRLFQMEMARRS
 ttttttβββββββtttttβββββββtttttββββtttttββββαααααααααααα

Figura 8. Predicción de estructura secundaria de la zona de la subunidad α de la PGA de *K. citrophila* más conservada entre las BLA. α , hélice alfa; β , estructura beta; t, giro beta. Se indica la posición de los residuos mutados en el plásmido pYKD60R19.

1.2.2. Mutagénesis mediante PCR empleando un oligonucleótido degenerado como iniciador.

El segundo método utilizado para mutagenizar la zona seleccionada consistió en alterar los residuos comprendidos entre la Pro43 y la Tyr51, mediante el diseño de un oligonucleótido que presentaba degeneradas las posiciones que codifican para estos residuos. En dicha región se encuentra la His44, que se supone potencialmente implicada en la catálisis.

Mediante PCR se amplificó un fragmento que tenía un tamaño de 136 pb, que se ligó al vector pYKD60 como se muestra la figura 7. La estrategia utilizada para analizar los clones fue básicamente la misma que la descrita en el apartado anterior. Tampoco se obtuvo ningún clón capaz de crecer sobre los medios selectivos de interés. Al analizar una muestra aleatoria de clones entre aquellos que crecieron sobre LB en presencia de cloranfenicol 35 µg/ml, se comprobó que las construcciones plasmídicas eran correctas. Las zonas de DNA que habían sido amplificadas se secuenciaron, comprobándose que presentaban mutadas todas las posiciones. Esto se traduce en cambios extensivos de la secuencia aminoacídica, que podrían ser los responsables de una alteración estructural que inactivase la enzima.

1.3. CAMBIO DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO A TRAVES DE PRESION SELECTIVA.

Una técnica empleada con éxito en la obtención de enzimas con nuevas especificidades de sustrato ha sido la presión selectiva (Francis y Hansche, 1972; Wills y Phelps, 1975; Clarke, 1978; Hall, 1981). Aplicando esta técnica se han conseguido mutantes de las PGA. Por ejemplo, Daumy y col. (1985a, b) obtuvieron mutantes de las cepas productoras de PGA, *E. coli* W y *P. rettgeri*, con actividad frente a bromohexanoil y metiladipoilamidas, tras someter las cepas nativas a presión selectiva utilizando como única fuente de nitrógeno las amidas sobre las que se deseaba encontrar actividad enzimática. Con posterioridad, otros grupos han obtenido mutantes que codifican PGA con nuevas especificidades de sustrato (Forney y col., 1989a, b) pero no han determinado los aminoácidos implicados en el cambio de especificidad. Por ello, se consideró de interés investigar la posibilidad de obtener una PGA mutante mediante presión selectiva, capaz de hidrolizar nuevos sustratos y determinar los aminoácidos mutantes.

1.3.1. Obtención y aislamiento de mutantes.

Para llevar a cabo el proceso de mutagénesis fue necesario construir la cepa TD21 (*mutT1*, *mutD5*, Δ [*ara-leu*], *argE3*, *hisG4*) siguiendo el proceso que se detalla en Materiales y Métodos, y transformarla con el plásmido pYKD59. Las células de *E. coli* TD21 (pYKD59) se cultivaron a 37 °C durante 18 horas en medio LB con cloranfenicol a 35 µg/ml, se centrifugaron, se lavaron con NaCl 0,9 % y posteriormente se seleccionaron por su capacidad de crecer en un medio mínimo M9 que contenía adipil-L-leucina o τ -(D)-aminoadipil-L-leucina como única fuente de L-leucina. A los 6-8 días de incubación aparecieron varias colonias en las placas con adipil-L-leucina, pero no aparecieron colonias en las placas con τ -(D)-aminoadipil-L-leucina.

Tras realizar ensayos de actividad sobre adipil-L-leucina con las colonias que habían crecido sobre este sustrato, se comprobó que la actividad era máxima a pH 5. Por tanto, la selección se repitió utilizando placas tamponadas a ese pH. Después de 4-5 días aparecieron de nuevo colonias sobre las placas con adipil-L-leucina pero no se detectaron colonias sobre las placas con τ -(D)-aminoadipil-L-leucina.

Se comprobó el fenotipo de la mutación responsable de esta nueva actividad enzimática extrayendo el plásmido pYKD59 de las cepas de *E. coli* TD21 que crecían sobre adipil-L-leucina y transformando *E. coli* HB101, que por ser auxótrofa para L-leucina, también permite la selección de este tipo de mutantes. Las células transformadas con los plásmidos mutantes fueron capaces de crecer sobre placas que contenían como única fuente de L-leucina adipil-L-leucina, mientras que las células transformadas con el plásmido original no crecieron. Estos resultados, junto al ensayo *in vitro* de actividad de

la PGA mutante sobre adipil-L-leucina, indicaban que mutaciones en el gen *pac* eran probablemente responsables de la nueva especificidad de sustrato adquirida por la PGA de *K. citrophila*.

1.3.2. Secuenciación del los genes *pac* mutantes.

Para determinar las mutaciones responsables de la nueva especificidad de sustrato, se procedió a la secuenciación del gen *pac* de dos plásmidos mutantes, denominados pMPA1 y pMPA2, y del gen *pac* nativo del plásmido pYKD59. La secuenciación del gen *pac* nativo fue necesaria ya que en análisis previos se habían detectado algunos errores en la secuencia descrita (Barbero y col., 1986). Se encontró que el plásmido pMPA1 contenía una transversión (T/G) en la posición 1,163 que supone el cambio Phe360Val, mientras que el plásmido pMPA2 presentaba la misma mutación en la posición 1,163 y otra transversión adicional (T/G) en la posición 2,155 cambiando Asp690Glu. Esto sugería que la mutación Phe360Val era responsable del cambio de especificidad. Sorprendentemente, la mutación se localizó en la subunidad β de la PGA, una región que no se suponía involucrada en el reconocimiento del resto acilo del sustrato (Daumy y col., 1985a, b).

Para confirmar que la mutación estaba localizada en la subunidad β de la PGA, se construyeron dos genes *pac* quiméricos (figura 9). Sólo las células de *E. coli* (pMB1) que contienen el gen *pac* quimérico con la subunidad β mutante crecieron en adipil-L-leucina.

1.3.3. Construcción del mutante Phe360Val por mutagénesis dirigida.

Para confirmar que esta mutación y no otra, era la responsable del cambio de especificidad de la PGA, se creó por mutagénesis dirigida un gen *pac* que contenía la mutación Phe360Val (figura 10). Las células recombinantes de *E. coli* HB101 que portaban el plásmido resultante de la mutagénesis, pADL, fueron capaces de crecer en medio mínimo con adipil-L-leucina como única fuente de L-leucina.

1.3.4. Purificación de las PGA nativa y mutante.

Con el fin de caracterizar de forma precisa los cambios estructurales y cinéticos que presentaba la proteína ADL, se purificaron en paralelo la PGA nativa y la mutante ADL, siguiendo el protocolo indicado en Materiales y Métodos. El resultado de la purificación se muestra en la figura 11.

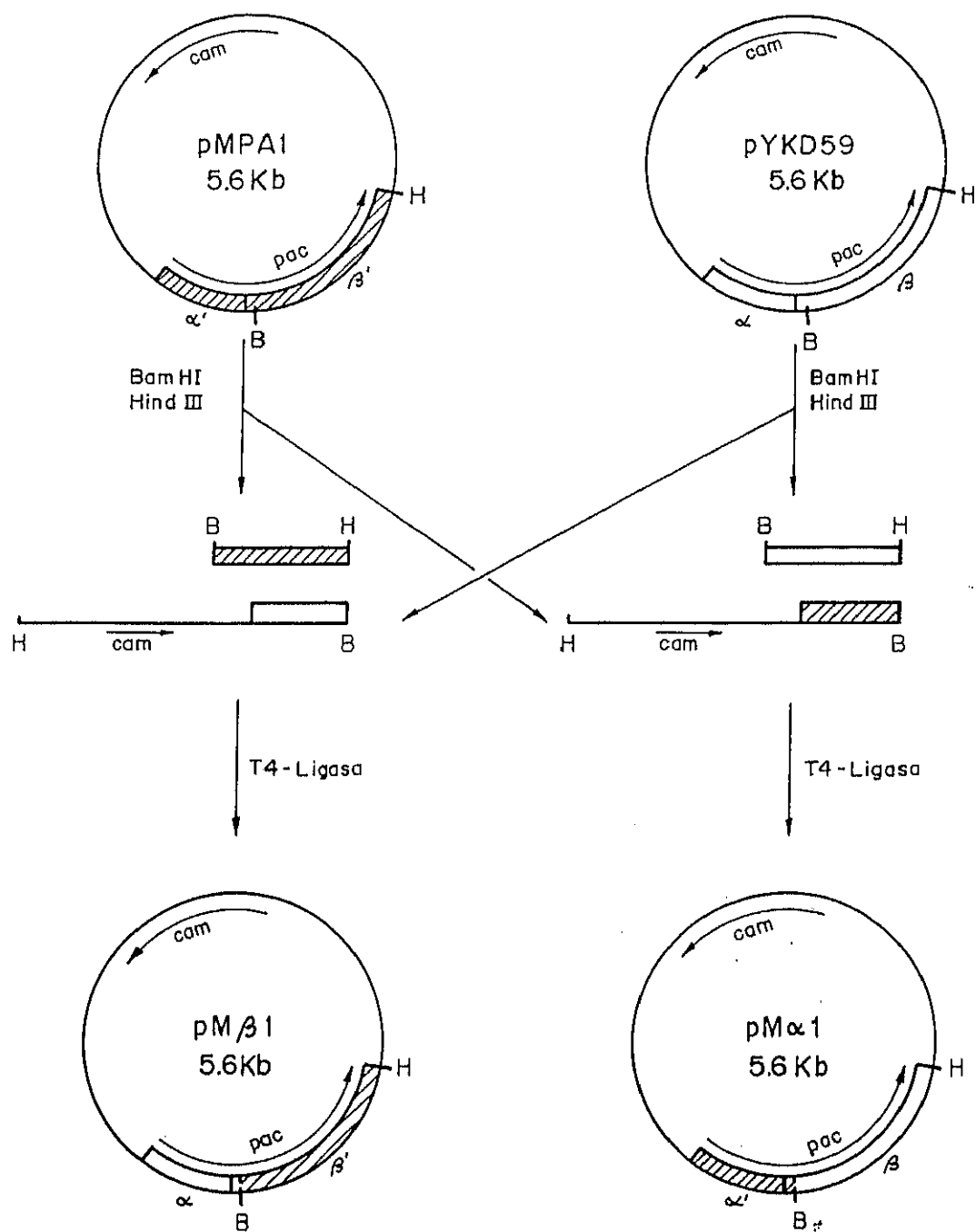


Figura 9. Construcción de los plásmidos que codifican para las PGA quiméricas. Los plásmidos vienen representados por círculos, se indican los elementos relevantes y los sitios de restricción. Las abreviaturas utilizadas para las dianas de restricción más relevantes son: B, *Bam*HI; *cam*, resistencia a cloranfenicol; H, *Hind*III; T4-ligasa, DNA ligasa de T4. Línea gruesa, vector; caja rayada, gen *pac* mutante; caja blanca, gen *pac* nativo. Las direcciones de transcripción de los genes se indican con una flecha. α , α' , β y β' representan las subunidades α y β de las PGA nativa y mutante respectivamente.

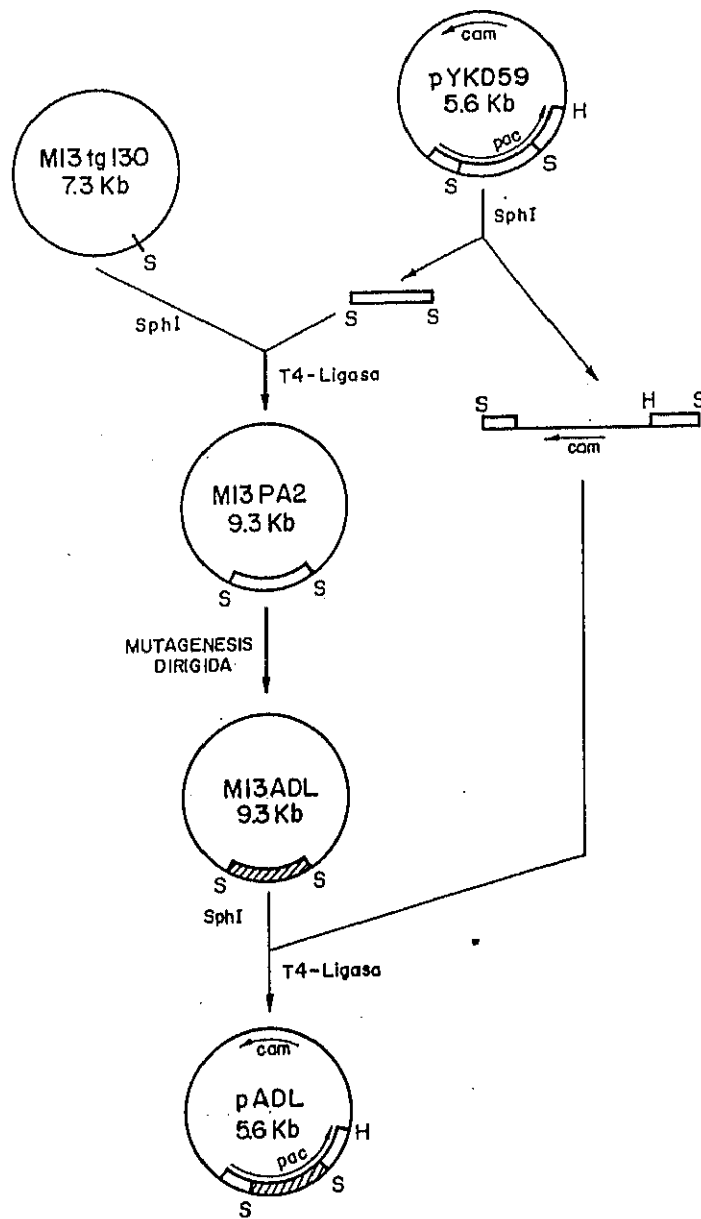


Figura 10. Construcción del plásmido pADL que codifica para la PGA mutante obtenido por mutagénesis dirigida. Los plásmidos y los fagos M13 están dibujados con círculos, se muestran los elementos relevantes y los sitios de restricción. Línea gruesa, vector; caja rayada, gen *pac* mutante; caja blanca, gen *pac* nativo. Las direcciones de transcripción de los genes se indican con una flecha. Abreviaturas: *cam*, resistencia a cloranfenicol; H, *HindIII*; S, *SphI*; T4-ligasa, DNA ligasa de T4.

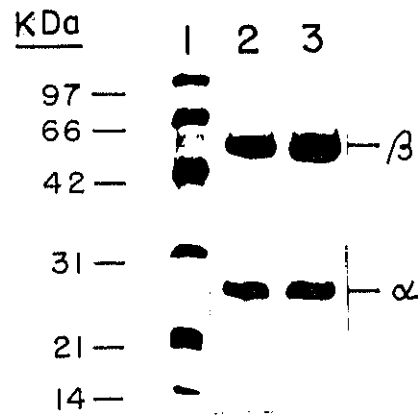


Figura 11. Purificación de las proteínas PGA y ADL. SDS-PAGE de PGA nativa (pocillo 2) y mutante ADL (pocillo 3) una vez completado el proceso purificación. En el pocillo 1 se muestran los patrones de masa molecular.

1.3.5. Construcción de quimeras proteicas de las PGA nativa y mutante.

Dada la posibilidad que ofrece la PGA de *E. coli* de poder ser sometida a procesos de desnaturalización y renaturalización (Lindsay y Pain, 1990), se procedió a separar las subunidades α y β de la PGA nativa y mutante ADL, mediante FPLC en Superose 12 en presencia de cloruro de guanidinio 6M (figura 12). Mezclando equimolecularmente las subunidades α y β , se renaturalizaron tanto la PGA nativa como la mutante ADL, además de crear proteínas quiméricas intercambiando las subunidades α y β de una y otra. En la tabla 8 se muestra que después de este tratamiento, la subunidad β mutante proporciona la capacidad de hidrolizar adipil-L-leucina. Las proteínas quimeras muestran un grado de recuperación de su actividad mayor cuando ésta se ensaya sobre NIPAB. El proceso de renaturalización de las subunidades α y β podría haber alterado la estructura del centro activo, de tal manera que el acceso de los sustratos derivados de L-Leu se viera dificultado, a diferencia de lo que ocurre con NIPAB.

1.3.6. Caracterización de la actividad enzimática del mutante ADL.

Como se ha mencionado anteriormente la actividad hidrolítica de la proteína ADL sobre adipil-L-leucina es máxima a pH 5,0 (figura 13), obteniéndose los siguientes valores para sus constantes catalíticas, $K_M = (1,60 \pm 0,09) \times 10^{-3}$ M y $k_{cat} = 2,6 \pm 0,1$ s⁻¹.

A continuación se investigó la capacidad de la ADL para hidrolizar nuevos sustratos en comparación con la PGA nativa (tabla 9). La ADL fue capaz de hidrolizar a pH 5,0 glutaril-, valeril-, caproil-, heptanoil- y fenoxiacetil-L-leucina con mayor eficiencia que la PGA nativa. Sin embargo, presentó una menor actividad sobre fenilacetil-L-leucina. Ambas enzimas poseen, sin embargo, capacidades hidrolíticas equivalentes sobre el 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoato (NIPAB) y el *p*-nitrofenil-fenilacetato (PNPA) (tabla 10). La ADL fue muy poco eficiente sobre las penicilinas y no fue activa sobre el glutaril-7-ACA, sugiriendo que su capacidad de hidrolizar penicilinas ha sido parcialmente afectada. La nueva propiedad de hidrolizar adipil- o glutaril-L-leucina no confiere a la enzima capacidad de hidrolizar cualquier adipil- o glutaril-derivado.

En la tabla 10 se muestran los parámetros cinéticos de la hidrólisis de NIPAB y de PNPA por las enzimas PGA y ADL.

Tabla 8. Actividad hidrolítica de las quimera de PGA construidas por desnaturalización, aislamiento y renaturalización de las subunidades α y β .

SUBUNIDADES ^a		ACTIVIDAD (nmol/min x mg proteína)			
α	β	NIPAB ^b	Adipil-L-Leu ^c	Fenilacetil-L-Leu ^d	
				pH 5	pH 8
nativa	nativa	3400	n.d. ^e	16103	25760
nativa	mutante	5800	455	8165	13940
mutante	nativa	3400	n.d.	12467	16532
mutante	mutante	5700	685	12471	18691
nativa control		4000	n.d.	22603	28291
mutante control		6600	1400	11842	15007

a. nativa y mutante significan las subunidades nativa y mutante respectivamente. Las enzimas fueron purificadas de *E.coli* HB101 (pYKD59) y *E.coli* HB101 (pADL), respectivamente. La pureza se determinó por electroforesis en SDS (Laemmli, 1970). La concentración de la enzima se determinó espectroscópicamente ($\epsilon_{280} = 22,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Barbero y col., 1986; Wetlaufer, 1962). Los péptidos α y β se separaron según Lindsay y Pain (1990).

b. La actividad sobre NIPAB se determinó a pH 7,5 y 25 °C (Kutzbach y Rauenbusch, 1974). La concentración de NIPAB empleada fue de $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ y la de enzima $2,6 \times 10^{-8} \text{ M}$.

c. La actividad sobre adipil-L-leucina se determinó colorimétricamente a pH 5 y 37 °C (Moore y Stein, 1948). La concentración de adipil-L-leucina fue $8 \times 10^{-3} \text{ M}$ y la de enzima $2,3 \times 10^{-7} \text{ M}$.

d. La actividad sobre fenilacetil-L-leucina se determinó en las mismas condiciones que la actividad sobre adipil-L-leucina, pero a pH 5 y pH 8.

e. n.d. significa actividad no detectada.

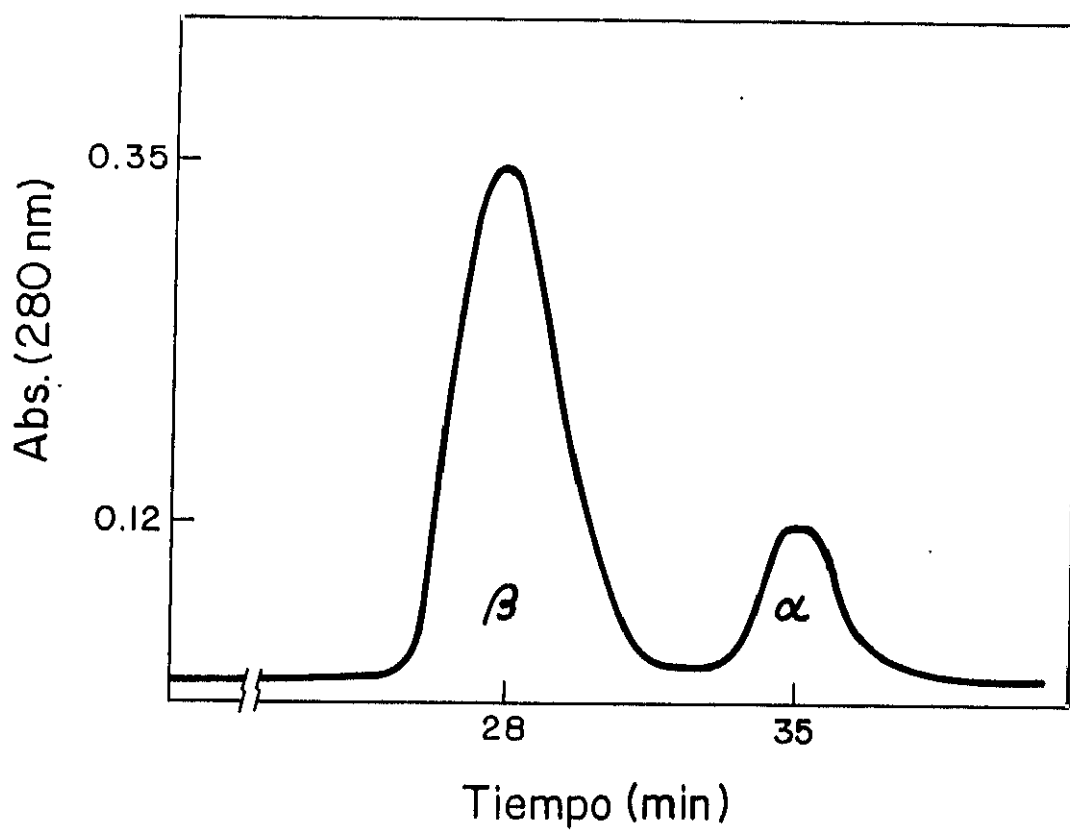


Figura 12. Perfil de elución de las subunidades α y β de la PGA. Se utilizó una columna de filtración en gel de Superosa 12 HR10/30. El tampón de elución utilizado fue fosfato 100 mM pH 7,5 en presencia de cloruro de guanidinio 6M.

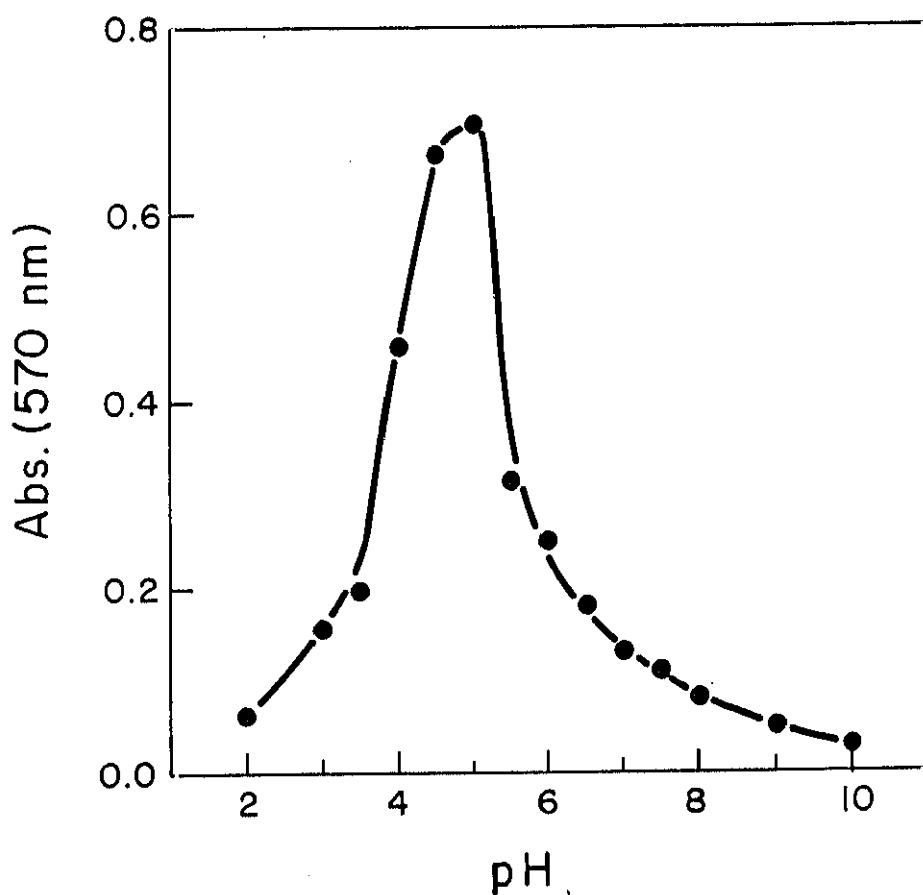


Figura 13. Dependencia con el pH de la actividad hidrolítica de la proteína ADL sobre adipil-L-leucina. El ensayo se realizó en los siguientes tampones: tampón acetato 100 mM entre pH ,0 y 6,0; tampón fosfato 100 mM entre pH 6,0 y 8,0 y tampón Tris-HCl 100 mM entre pH 8,0 y 10,0. Tras 10 min de reacción a 37 °C, la L-leucina liberada se cuantificó colorimétricamente con ninhidrina (Moore y Stein, 1948). Las concentraciones de enzima y sustrato en el ensayo fueron de $1,1 \times 10^{-6}$ M y $1,3 \times 10^{-6}$ M, respectivamente.

Tabla 9. Actividades hidrolíticas de la PGA mutante y nativa.

SUSTRATO	ACTIVIDAD (nmol/min x mg proteína) ^a			
	pH 5,0		pH 8,0	
	MUTANTE	NATIVA	MUTANTE	NATIVA
Adipil-L-leucina	1496	n.d. ^b	768	n.d.
Glutaril-L-leucina	974	n.d.	25	n.d.
Fenilacetil-L-leucina	11842	22603	15007	28291
Fenoxiacetil-L-leucina	680	487	300	593
Acetil-L-leucina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Terbutil-L-leucina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Caproil-L-leucina	540	191	469	335
Valeril-L-leucina	597	n.d.	217	42
Heptanoil-L-leucina	38	n.d.	23	n.d.
Octanoil-L-leucina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Penicilina G	1009	37050	1160	41710
Penicilina V	160	375	72	1349
Penicilina Dihidro-F	n.d.	535	n.d.	2095
Glutaril-7-ACA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cefalosporina C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NIPAB ^c	8200	1600	12100	10300

a. Las actividades se determinaron a 37 °C. Las enzimas se purificaron de *E.coli* HB101 (pYKD59) y *E.coli* HB101 (pADL). La hidrólisis de los antibióticos se determinó según Balasingham y col. (1972).

b. n.d. significa no detectada o menor de 20 nmol/min x mg de proteína.

c. La actividad sobre NIPAB se determinó a 30 °C.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de las PGA mutante y nativa.

SUSTRATO	ENZIMA	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M (μM ⁻¹ s ⁻¹)
NIPAB	nativa	27	11	2,3
	mutante	28	22	1,6
PNPA	nativa	82	57	1,4
	mutante	39	11	3,7

Las enzimas se purificaron de *E.coli* HB101 (pYKD59) (nativa) y *E.coli* HB101 (pADL) (mutante). Las velocidades iniciales se midieron a 25 °C con NIPAB (anilida) y PNPA (ester) en 100mM tampón fosfato sódico, pH 7,5. Las hidrólisis del 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoato (NIPAB) y *p*-nitrofenil-fenilacetato (PNPA) se determinaron colorimétricamente (Kutzbach y Rauenbusch, 1974).

1.3.7. Estudios de inhibición.

1.3.7.1. Inhibición por fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

Cuando se compara la reacción con fenilmetilsulfonilo (PMSF) de la PGA nativa y de la ADL, se observa que la enzima mutante se comporta de un modo similar a la enzima nativa, es decir, la inhibición es lineal y la intersección con el eje de abscisas coincide con la concentración molar de centros activos (figura 14). La mutación Phe360Val no parece haber alterado la capacidad de unión de PMSF a la serina catalítica.

Por otro lado, el estudio de inhibición con PMSF ha permitido determinar con exactitud la concentración molar de centros activos de ambas enzimas. Se ha comprobado que el grado de inhibición enzimática es proporcional a la cantidad de PMSF existente en la incubación, de tal modo que la pérdida total de actividad se alcanza a una concentración de PMSF que coincide con la concentración de proteína calculada espectrofotométricamente o mediante el método de Bradford. Ello indica que las preparaciones de PGA nativa y mutante están constituidas por una población homogénea de moléculas activas de enzima.

1.3.7.2. Inhibición por ácido fenilacético.

La inhibición que produce el ácido fenilacético (FA) en la hidrólisis de penicilina G por la PGA de *E. coli*, se ha caracterizado como competitiva, encontrándose un valor de K_i calculado en el intervalo de 28 y 200 μM , dependiendo de los autores y de la sensibilidad del método empleado (Kutzbach y Rauenbusch, 1974; Berezin y col., 1974; Veronese y col. 1981). Sin embargo, la inhibición por FA sobre la PGA de *K. citrophila* no se había caracterizado. Por ello, se procedió a estudiar la naturaleza de la inhibición por FA en la hidrólisis del ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico (NIPAB) catalizada por la PGA de *K. citrophila*, y se ha comparado con la inhibición que se produce cuando la reacción se lleva a cabo con la enzima mutante. Como se muestra en la figura 15 la inhibición es competitiva tanto para la PGA nativa como para la mutante ADL.

Los valores de K_i para la enzima nativa y mutante son muy similares, y están dentro del intervalo de valores obtenidos previamente para la PGA de *E. coli* (tabla 11).

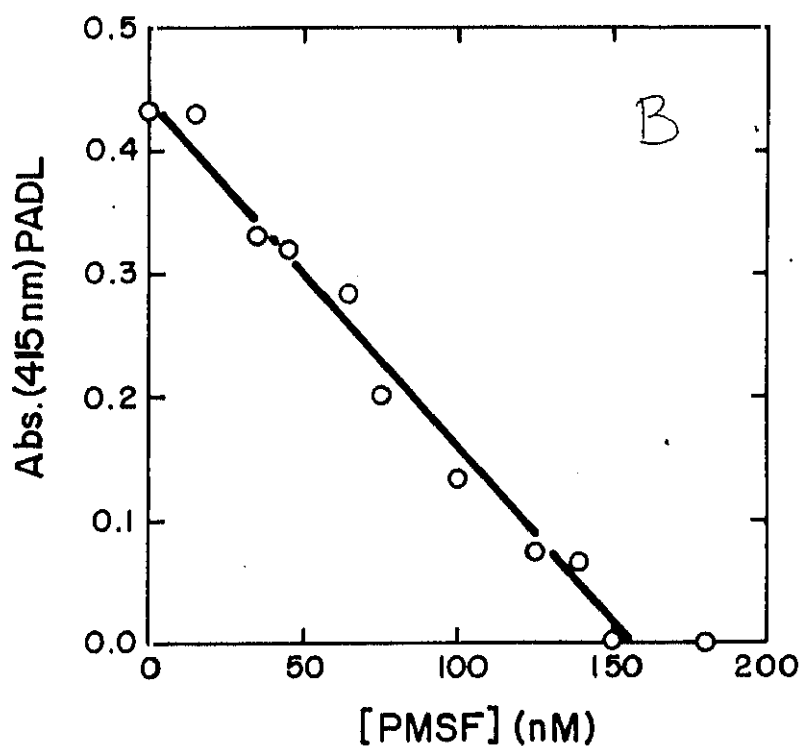
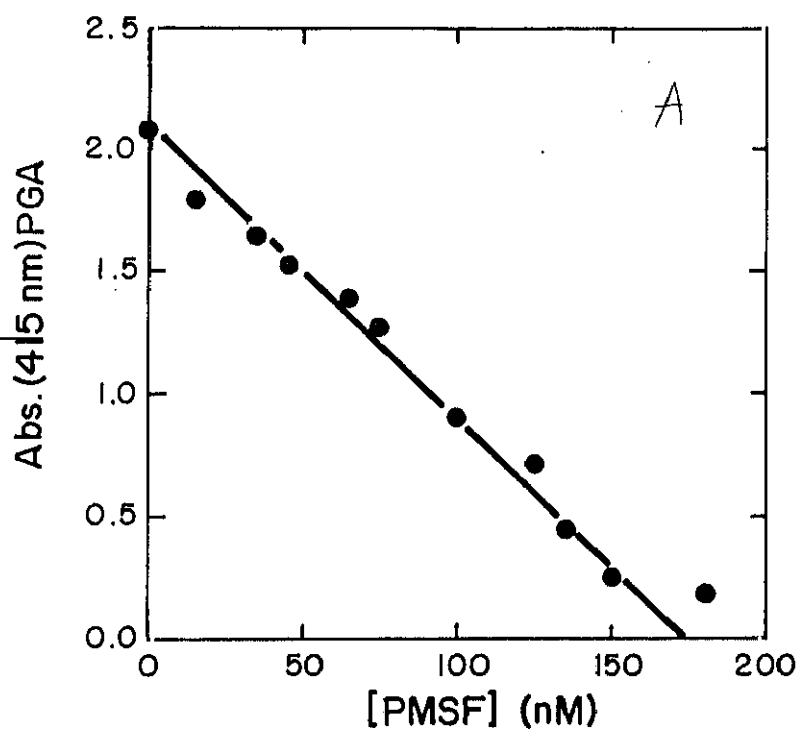


Figura 14. Inhibición de la PGA por PMSF. A. PGA nativa. B. mutante ADL. Las concentraciones de las PGA nativa y mutante en el ensayo fueron de 170 nM y 150 nM, respectivamente. Tras su inhibición con PMSF se valoró la actividad enzimática remanente empleando como sustrato penicilina G 1,7 mM. La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato 100 mM pH 7.5 durante 10 min a 37 °C.

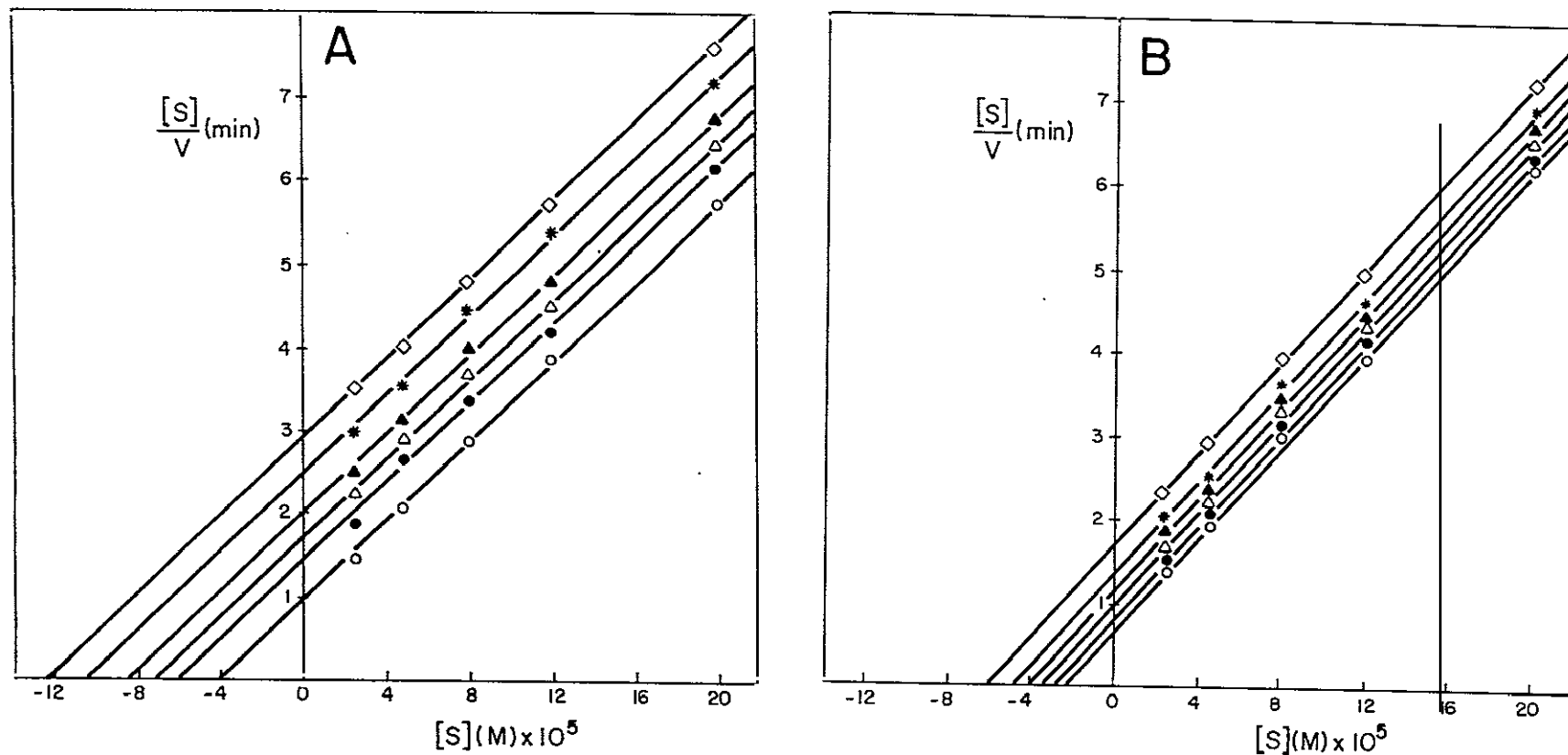


Figura 15. Inhibición competitiva de la PGA nativa (A) y mutante ADL (B) por FA. Representación de Hanes-Woolf (Segel, 1975). El sustrato (S) utilizado ha sido NIPAB. Las concentraciones de FA empleadas fueron las siguientes: (o) control sin FA, (●) $3,7 \times 10^{-5}$ M, (Δ) $5,6 \times 10^{-5}$ M, (Δ) $8,7 \times 10^{-5}$ M, (*) $1,3 \times 10^{-4}$ M, (\diamond) $1,7 \times 10^{-4}$ M. La concentración de PGA y ADL fue de $4,3 \times 10^{-8}$ M. El ensayo se realizó en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 a 22 °C.

Tabla 11. Determinación de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de NIPAB por la PGA nativa y el mutante ADL, en presencia de ácido fenilacético.

ENZIMA	K_i (μM)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})
PGA	$(88,0 \pm 3,0)$	$(42,2 \pm 1,3)$	$15,8 \pm 2,0$
ADL	$(85,1 \pm 7,2)$	$(19,0 \pm 1,5)$	$13,1 \pm 2,6$

Las medidas de velocidad inicial se han realizado a 25 °C en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5. La concentración final de enzima en el ensayo fue de $4,3 \cdot 10^{-8}$ M. Se indica el valor principal \pm la desviación estándar calculada a partir de tres ensayos independientes para cada uno, como mínimo.

1.3.8. Predicción de estructura secundaria y comparación de secuencias.

Con objeto de determinar si el cambio Phe360Val ha introducido una alteración en la estructura secundaria de la proteína, que pudiera ser responsable del cambio de especificidad, se realizó un estudio comparativo de predicción de estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos cercana al residuo Phe360, tanto en la proteína nativa como en la mutante (figura 16A). Para ello se emplearon los programas PEPTIDESTRUCTURE y PEPLOT. El resultado refleja cómo, en ambos casos, la zona circundante al residuo 360 posee una estructurada no ordenada, por lo que el cambio Phe360Val no introduciría modificaciones en la estructura secundaria de esta zona de la proteína. Por tanto, el cambio de especificidad no podría justificarse como una consecuencia directa del cambio de estructura secundaria en la zona de la mutación. Estos estudios son indicativos de los que podría ocurrir a nivel estructural, pero para poder determinar con exactitud si hay alteraciones estructurales en el mutante se deberá localizar este residuo dentro de la estructura tridimensional de la PGA ya determinada (Duggleby y col. 1995).

La comparación de la secuencia de aminoácidos en esta zona entre diferentes BLA revela un elevado grado de similitud (figura 16B). El residuo de Phe360 se conserva en otras cinco BLA, siendo sustituido por un residuo de prolina en la PGA de *A. faecalis*. Este hecho está en concordancia con la ausencia de una estructura en α -hélice o lámina β en esta zona, sugiriendo que el cambio Phe360Val no debería producir el cambio de especificidad de sustrato observado.

1.3.9. Espectros de dicroísmo circular.

Con la finalidad de comprobar si la mutación Phe360Val induce cambios significativos en la estructura secundaria y/o terciaria de la PGA mutante en comparación con la nativa, se han obtenido los espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta próximo y lejano de ambas proteínas, a pH 8,0 y a pH 5,0 (figura 17). La ADL posee espectros de DC esencialmente idénticos a los de la PGA nativa. Esto sugiere que el cambio Phe360Val no produce alteraciones significativas sobre la estructura secundaria y/o terciaria. Sin embargo, ambas enzimas muestran un cambio pequeño pero significativo en el espectro a pH 5,0 respecto del obtenido a pH 8,0.

360
|
WT NGTISWGSTAGFGDDVDIFAELLSAEKPGYYQHN
cccccccccccccccccaaaaaaaaaaatttBBBBB
MUT NGTISWGSTAGVGDDVDIFAELLSAEKPGYYQHN
cccccccccccccccccaaaaaaaaaaatttBBBBB

```

360
|
KLU  NGTISWGSTAGFGDDVDIFAELSAEKP GYYQH
**      * * * * *      * * * *
ESC  NGVISWGSTAGFGDDVDIFAERLSAEKP GYYLHN
**      * * * * *      * * *
PRO  NGHVSWGSTAGFGDGV DIFAEQVSPEDPNSYLHQ
*      * *      * * *      *
ALC  NSEIAWGATAGPQDVVDIYQEKLMPSRADQYWFN
*      *      *      * * * *      *
SE83 NGKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQFAEDGRTARFGN
** **      * * * *      * * *      *
N176 NGKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQFAGEGRTARFGN
** **      * * * *      * * *      *
V22  NGKVAYCVTHAFMDIHDLYLEQFAEEGRTARFGN
** *      *      * * *
A14  NGTIAFGLTIFNIDQEDLYVYELNPANPDQYRYR
**      * *      *      *
GK16 NGMV--GATNYRLTLODGGYLYDGOVRPFERROA

```

111

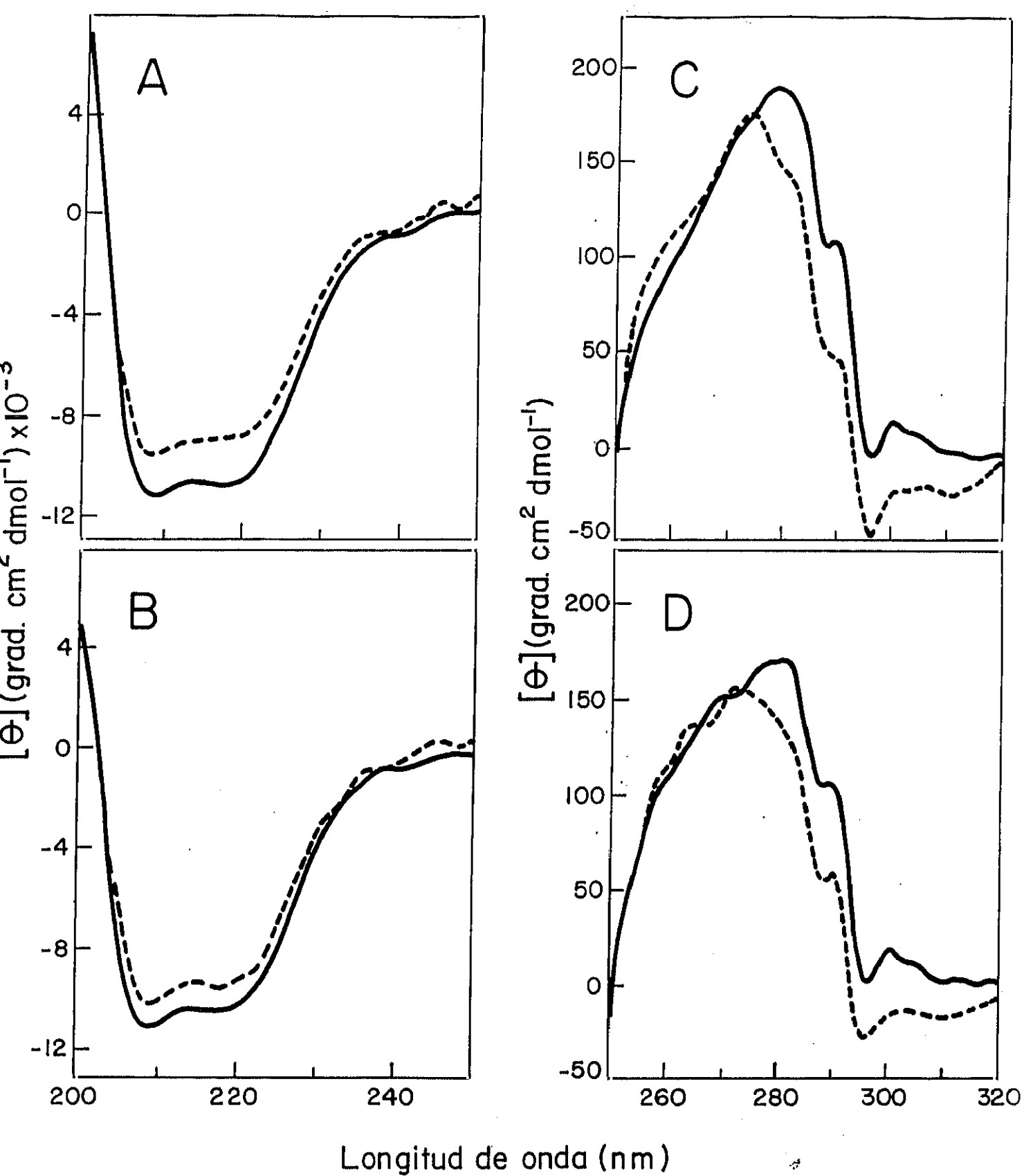


Figura 17. Espectros de DC de las PGA nativa y mutante a pH 5 y 8. Los espectros de DC de las PGA nativa (A y C) y mutante (B y D) se registraron a pH 8,0 (—) o pH 5,0 (---) en la zona del UV-lejano (A y B) y próximo (C y D).

2. ESTUDIO DEL MECANISMO CINETICO DE LA PGA.

Se ha propuesto que el mecanismo catalítico de la PGA es similar al de las serín-proteasas. El mecanismo catalítico de esta familia de enzimas transcurre a través de la formación de un intermedio covalente acil-enzima, siguiendo el esquema de reacción que se muestra en la figura 18.

Aunque se han realizado estudios que apoyan este mecanismo (Konecny, 1981), aún no se ha conseguido detectar y analizar el intermedio covalente acil-enzima, prueba irrefutable de su existencia. De ahí que el motivo principal del trabajo que se va a exponer a continuación haya sido intentar detectar el intermedio acil-enzima (ES'), así como caracterizar sus constantes cinéticas de acilación (k_2) y desacilación (k_3).

El conocimiento de los parámetros cinéticos de la PGA ha estado limitado al estado estacionario, y estos datos sólo han aportado una información limitada acerca del mecanismo catalítico de la enzima. Para poder detectar cualquier intermedio de reacción, es fundamental estudiar la reacción en el estado pre-estacionario. El análisis de cinéticas rápidas conlleva el empleo de un equipo de flujo detenido (ver apartado 2.4).

Estos estudios se han llevado en paralelo con la PGA nativa, y con la mutante ADL, pues la determinación del mecanismo enzimático para cada enzima y su comparación podría resultar de gran utilidad a la hora de diseñar enzimas con mejor eficiencia catalítica.

2.1. ESTUDIOS PRELIMINARES.

2.1.1. Ensayos con *p*-nitrofenilfenilacetato.

La primera aproximación para realizar los estudios en el estado pre-estacionario consistió en utilizar como sustrato el *p*-nitrofenilfenilacetato (PNPA). Los parámetros cinéticos para este sustrato ya se habían determinado con la PGA nativa y mutante (tabla 10). Aunque los valores de k_{cat} eran relativamente elevados para poder estudiar cinéticas rápidas, se decidió analizar en el equipo de flujo detenido la hidrólisis, tanto con la PGA nativa como con la mutante ADL, para intentar detectar la formación de algún "burst" (figura 19) que nos indicara que el estudio en el estado pre-estacionario era factible con este sustrato. Los resultados obtenidos tras varios intentos confirmaron que la cinética es demasiado rápida para detectar un intermedio con este procedimiento. La reacción que se observa en un periodo de milisegundos corresponde al estado estacionario.

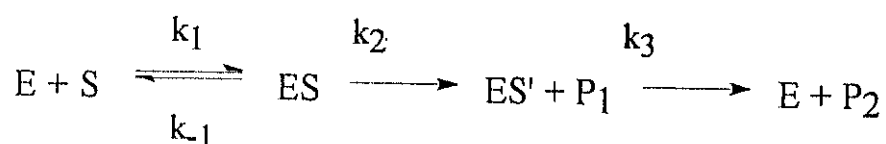


Figura.18. Esquema del mecanismo catalítico de serín-proteasas. E, enzima libre; S, sustrato; ES, complejo enzima-sustrato; ES', intermedio covalente acil-enzima; P₁ y P₂, productos de la reacción. k₁ representa la constante de asociación enzima-sustrato, k₋₁ la constante de disociación enzima-sustrato, y k₂ y k₃, son las constantes de velocidad de primer orden de la acilación y desacilación, respectivamente, del intermedio acil-enzima.

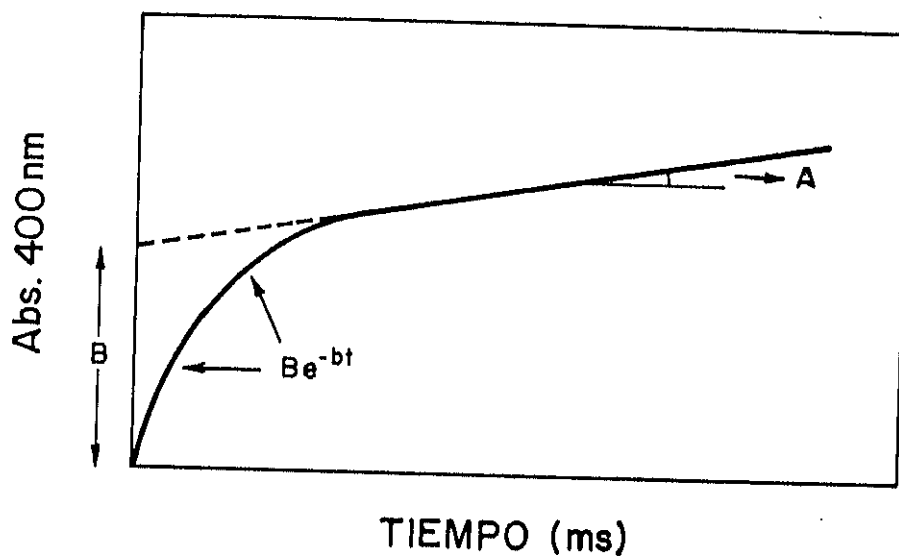


Figura 19. Cinética característica de la formación de un intermedio covalente acil-enzima, durante la hidrólisis de un éster de *p*-nitrofenol catalizada por una serín-proteasa. B, amplitud del "burst". b, constante de velocidad del "burst". A, velocidad inicial en estado estacionario.

2.1.2. Ensayos con etil-fenilacetato.

Dada la imposibilidad de utilizar el PNPA para el estudio cinético en el estado pre-estacionario, se analizó la posibilidad de utilizar otro éster del ácido fenilacético, el etil-fenilacetato. Este reactivo se ha descrito como un sustrato específico de la PGA (Margolin y col., 1980), siendo sus constantes catalíticas para la PGA de *E. coli* $k_{cat} = 170 \text{ s}^{-1}$ y $K_M = 4,5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Con el etil-fenilacetato no se puede seguir la hidrólisis registrando la variación de absorbancia, y por tanto, se ensayó un método alternativo de detección por fluorescencia. Este método se fundamenta en la variación de la emisión de fluorescencia de la fluoresceína, como consecuencia de un cambio de pH. Dicho cambio de pH resulta del aumento de la concentración de protones que se produce debido a la hidrólisis del etil-fenilacetato. Una vez ajustadas las condiciones del ensayo en el estado estacionario, se procedió a realizar el estudio con el equipo de flujo detenido. Manteniendo constante la concentración de fluoresceína en $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, se varió en primer lugar, la concentración de sustrato, desde $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ a $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ utilizando una concentración fija de enzima de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, tanto de la PGA nativa como de la mutante. En segundo lugar, se varió la concentración de enzima, desde 1×10^{-8} a $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, manteniendo una concentración de sustrato de $8 \times 10^{-5} \text{ M}$. Desafortunadamente, no se detectó ningún "burst" en estas condiciones. El elevado valor de la k_{cat} justificaría de nuevo la imposibilidad de utilizar este sustrato para analizar la hidrólisis en el estado pre-estacionario, incluso en el caso de la enzima mutante que presenta una actividad cuatro veces menor sobre el etil-fenilacetato, que la PGA nativa.

2.2. BUSQUEDA DE SUSTRATOS ALTERNATIVOS.

Los sustratos clásicos empleados en el estudio cinético de la PGA presentan una hidrólisis demasiado rápida como para estudiarse en condiciones de estado pre-estacionario. Además de los valores de k_{cat} de hidrólisis, hay otros factores que limitan el empleo de un determinado sustrato en este tipo de estudios, algunos se exponen a continuación:

i) El mecanismo catalítico de las serín-proteasas implica la formación de un intermedio acil-enzima tanto en la hidrólisis de sustratos amidas como en la hidrólisis de los ésteres. Sin embargo, hay un aspecto muy importante que diferencia la hidrólisis en ambos casos y que supone el paso limitante de la reacción. Está demostrado que en la hidrólisis de las amidas, el paso limitante lo constituye la etapa de acilación del intermedio ($k_2 < k_3$), mientras que en el caso de los ésteres, el paso limitante es la desacilación ($k_2 > k_3$) (Fersht, 1985). En la hidrólisis de ésteres el intermedio acil-enzima se acumula y es fácil de detectar, mientras que con amidas no se acumula, siendo

mucho más difícil su estudio cinético. Esto indica que es mejor seleccionar un éster para realizar el estudio.

ii) El sustrato a estudiar debe liberar durante el paso de acilación un primer producto (P_1) que pueda seguirse fácilmente por espectroscopía.

iii) La selección de un sustrato implica que su hidrólisis debe ser lo suficientemente lenta para poder seguirla en un tiempo de milisegundos, antes de alcanzar el estado estacionario. La limitación del tiempo de detección viene determinada por las especificaciones técnicas del equipo de flujo detenido.

iv) En muchas ocasiones un bajo valor de la k_{cat} viene acompañado de un elevado valor de la K_M , lo que conlleva a trabajar con elevadas concentraciones de sustrato para estar en condiciones de acilación. Esto no siempre es posible dadas las limitaciones de solubilidad de muchos compuestos.

La mayoría de los trabajos cinéticos realizados con las serín-proteasas para determinar la formación de intermedios mediante equipos de flujo detenido, han utilizado como sustratos, ésteres de *p*-nitrofenol.

Ante estos condicionamientos se decidió estudiar la posibilidad de emplear ésteres de *p*-nitrofenol, ampliamente utilizados en el análisis cinético de otras serín-proteasas, como la quimiotripsina, que fue la primera enzima de este grupo donde se estudió el mecanismo catalítico, usando *p*-nitrofenilacetato como sustrato (Hartley y Kilby, 1954).

2.2.1. Determinación de la actividad sobre diferentes ésteres de *p*-nitrofenol.

Los ésteres de *p*-nitrofenol no están descritos en la literatura como sustratos para la PGA, y por tanto, el primer paso consistió en ensayar la hidrólisis de una serie de ésteres de *p*-nitrofenol, y compararla con la que presenta la enzima nativa sobre sustratos amídicos como la penicilina G o el NIPAB, o sobre el *p*-nitrofenilfenilacetato.

El resultado obtenido indica que la PGA es capaz de hidrolizar ésteres de *p*-nitrofenol y que la hidrólisis de éstos es mucho más lenta que la de los sustratos convencionales (tabla 12).

Entre los ésteres de fenol el mejor sustrato para la PGA es el fenilacetato. La introducción del grupo nitro en la posición *para*, disminuye un 50 % la actividad específica, siendo mucho más desfavorable la posición en *orto*. La influencia de la longitud de la cadena lateral de acilo, parece ser decisiva, observándose una relación inversa entre el tamaño de las cadenas laterales y la actividad enzimática. Así, el incremento de cada metilo disminuye a la mitad la actividad de la PGA. El *p*-nitrofenilformato no es hidrolizado, quizás debido a que el pequeño volumen del grupo formilo no le permite establecer la unión al centro activo de la enzima, mientras que el *p*-nitrofeniltrimetilacetato no lo es por ser demasiado voluminoso, suponiendo un impedimento estérico para la hidrólisis enzimática.

Tabla 12. Actividad específica de la PGA sobre diferentes sustratos.

SUSTRATO	CONCENTRACION [M]	ACTIVIDAD ESPECIFICA ^a (nmol/min x mg)
Penicillina G	$1,3 \times 10^{-2}$	47.000 ± 2.000
<i>p</i> -Nitrofenil fenilacetato ^b	$1,0 \times 10^{-4}$	25.000 ± 1.200
NIPAB ^b	$3,0 \times 10^{-4}$	10.300 ± 850
Fenilacetato ^b	$5,0 \times 10^{-4}$	2.300 ± 136
<i>p</i> -Nitrofenilacetato ^b	$3,0 \times 10^{-4}$	1.600 ± 100
<i>p</i> -Nitrofenilpropionato ^b	$3,0 \times 10^{-4}$	1.000 ± 80
<i>p</i> -Nitrofenilbutirato ^b	$4,0 \times 10^{-4}$	430 ± 32
<i>p</i> -Nitrofenilvalerato ^b	$5,0 \times 10^{-4}$	270 ± 16
<i>o</i> -Nitrofenilacetato ^b	$3,0 \times 10^{-4}$	25 ± 2
<i>p</i> -Nitrofenilacetanilida ^b	$5,0 \times 10^{-4}$	$1 \pm 0,2$
<i>p</i> -Nitrofenilformato ^b	$5,0 \times 10^{-4}$	$<0,1^c$
<i>p</i> -Nitrofeniltrimetilacetato ^b	$5,0 \times 10^{-4}$	$<0,1^c$

^a La concentración final de enzima en el ensayo fue 1×10^{-7} M. El volumen final en el ensayo fue de 0.8 ml. Se indica el valor principal \pm la desviación standard calculada a partir de tres ensayos independientes, como mínimo.

^b La concentración final de acetonitrilo empleada en el ensayo fue de 0.5% (v/v).

^c La actividad estuvo por debajo de los límites de detección.

2.2.2. Determinación de la especificidad de la hidrólisis.

Los ensayos de actividad se realizaron con la proteína purificada, pero ante el descubrimiento de una nueva actividad no descrita para la PGA, se planteó la necesidad de demostrar que la PGA era realmente responsable de la hidrólisis de los ésteres de *p*-nitrofenol, y no una potencial esterasa que se hubiera copurificado con ella.

2.2.2.1. Ensayos de actividad con extractos crudos de la enzima.

Se ensayó la actividad frente a *p*-nitrofenilacetato de diferentes muestras sonicadas correspondientes a cultivos de la cepa de *E. coli* TG1 transformada con plásmidos que llevaban los genes que codificaban para las siguientes enzimas: la PGA de *K. citrophila* (PGAKC), la PGA de *E. coli* y la GLA de *Pseudomonas* sp. 83 (GLASP), así como un control de la cepa sin transformar. Solamente se observa hidrólisis de PNA cuando se encuentra presente la PGA (tabla 13). Este resultado apunta a que estamos frente a una actividad esterasa específica de la PGA.

2.2.2.2. Estudios de inhibición.

Para confirmar la especificidad de la actividad de la PGA sobre el *p*-nitrofenilacetato, y en consecuencia sobre el resto de ésteres de *p*-nitrofenol, se realizaron estudios de inhibición de la enzima con reactivos específicos cuyo comportamiento está bien caracterizado. Mediante dichos estudios, no se pretendió realizar un exhaustivo análisis del comportamiento cinético de cada una de los inhibidores ensayados, sino tener una visión general del grado de inhibición que ejercía cada uno de ellos.

El primer inhibidor ensayado fue el fluoruro de fenilmetisulfonilo (PMSF). Este inhibidor de serín-proteasas se sabe que inactiva totalmente a la PGA a una concentración equimolecular con el número de centros activos (Kutzbach y Rauenbusch, 1974; Prieto y col., 1990; Siewinski y col., 1984; Daumy y col., 1985). Al estudiar el efecto del PMSF durante la hidrólisis del PNA se observó el comportamiento típico de inhibición de la PGA. (figura 20A).

Otro conocido inhibidor de serín-proteasas es el diisopropilfluorofosfato (DFP), el cual no es capaz de inhibir a la PGA (Kutzbach y Rauenbusch, 1974). Al realizar el estudio de la inhibición de la hidrólisis del PNA por la PGA se pudo comprobar que la actividad esterasa responsable de la hidrólisis no respondía a inhibición por DFP, manteniéndose un 100 % de actividad tras la incubación de la PGA con 1 mM de DFP durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 13. Actividad sobre *p*-nitrofenilacetato de diferentes cultivos.

CEPA	PLASMIDO	ENZIMA	ACTIVIDAD ^a
TG1	pYKD59	PGAKC	++
TG1	pGA1	PGAEC	++
TG1	pJC200	GLASP	-
TG1	-----	-----	-

a. Los ensayos de actividad se realizaron sobre los cultivos sonicados, en tampón fosfato 100mM pH 7,5, a 22°C.

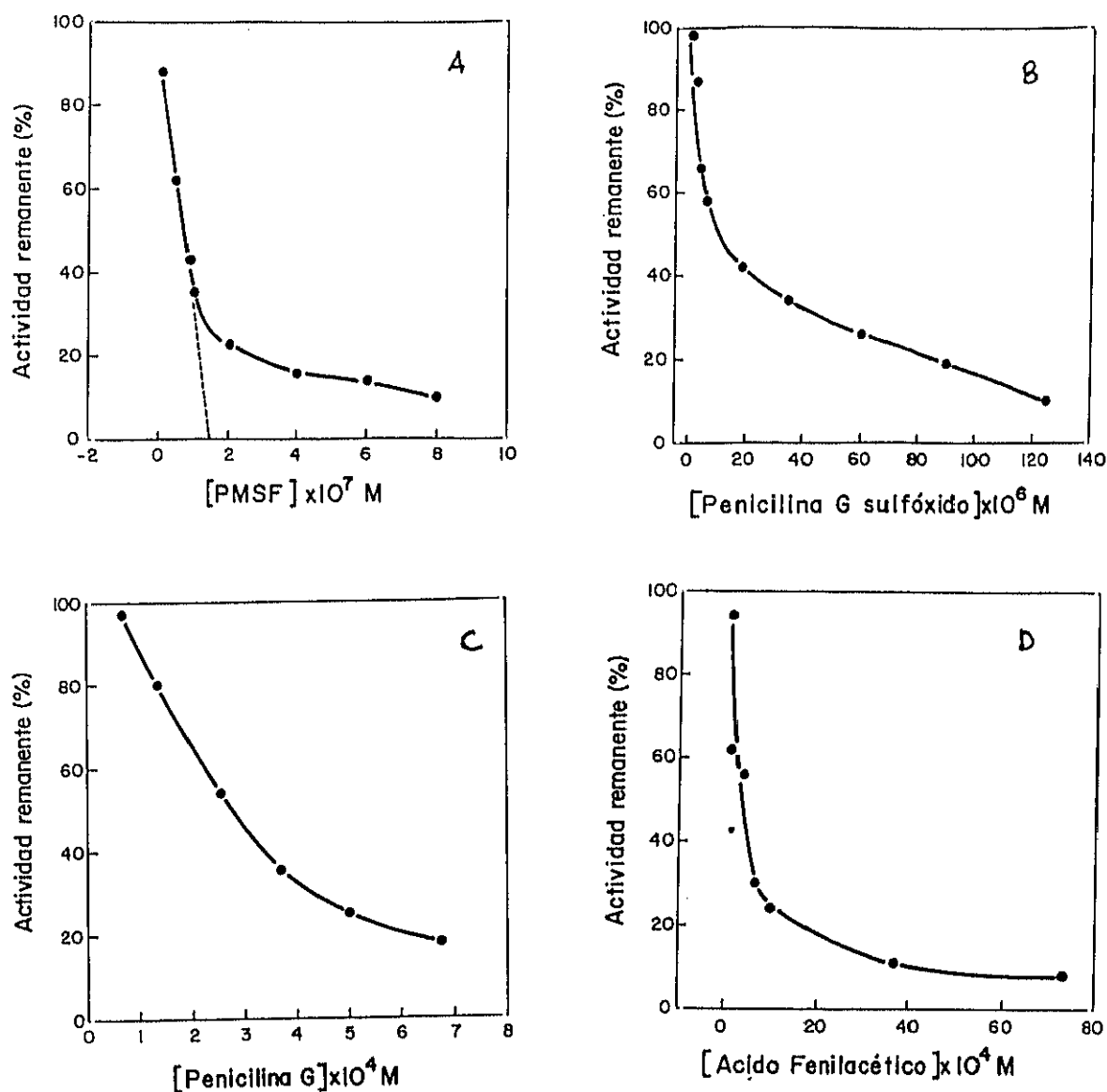


Figura 20. Inhibición de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato por (A) PMSF, (B) penicilina G sulfóxido, (C) penicilina G, (D) FA. Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 a 25 °C, en presencia de 0,5 % AcN (v/v). Las concentraciones finales de sustrato y enzima fueron de 5×10^{-5} M y 1×10^{-7} M, respectivamente. Las muestras se preincubaron 5 min en presencia de inhibidor antes de añadir el sustrato. El isopropanol utilizado para disolver el PMSF (0,2 % (v/v) en el ensayo) no afectó la actividad PGA.

Posteriormenteme, se analizó el efecto de dos inhibidores competitivos de la PGA, como son el ácido fenilacético (FA) y la penicilina G sulfóxido (Balashingam y col., 1972; Plaskie y col., 1978; Márquez y col., 1988; Martín y col., 1993). Aunque el resultado mostrado en la figura 20D y B, no permite concluir si la inhibición de la hidrólisis enzimática de PNA por FA o por la penicilina G sulfóxido es también competitiva, sí demuestra que ambos compuestos son buenos inhibidores de la reacción. Tanto la representación secundaria de Dixon, (Cornish-Bowden, 1974), como la representación de Hanes-Woolf (Segel, 1975), demostraron que la inhibición por FA era de tipo competitivo, obteniendo un valor de K_i de 7×10^{-4} M (figura 21).

Por otra parte se comprobó que la penicilina G actúa como un buen inhibidor (figura 20C). El ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) se mostró como un inhibidor menos eficaz. Se debe recordar que la inhibición de la PGA por 6-APA es de carácter no competitivo (Balasingham y col. 1972).

Estos resultados argumentan en contra de la presencia de una actividad esterasa contaminante y apoyan la especificidad de la hidrólisis de la PGA en la catálisis de los ésteres de *p*-nitrofenol. Lo cual representa una nueva actividad catalítica para la enzima.

2.2.3. Efecto del pH.

El estudio de la influencia del pH en la actividad catalítica permite una primera caracterización de los grupos ionizables que son esenciales en su funcionalidad. Con este objeto se determinó la influencia del pH en la actividad enzimática en estado estacionario en un intervalo de pH entre 4,5 y 9 (figura 22). El pH óptimo para la hidrólisis, así como la forma de la curva y los correspondientes valores de pK obtenidos, fueron muy similares a los que se habían determinado para la PGA en la hidrólisis de la penicilina G (Martín y col., 1993a).

2.2.4. Requerimientos estructurales de los ésteres de fenol para su hidrólisis por la PGA.

La determinación más precisa de los requerimientos estructurales de los ésteres de fenol para su hidrólisis por la PGA se investigó mediante estudios de inhibición de la hidrólisis del PNA, con compuestos que presentaban diferentes grados de homología estructural con el sustrato (tabla 14). Debido a los problemas de solubilidad que presentaban algunos de estos compuestos sólo se ha podido determinar la concentración necesaria para producir el 30 % de inhibición.

Los datos obtenidos indican que sólo algunas combinaciones específicas entre la parte del grupo amino o alcohol y el resto acilo pueden acomodarse en el centro activo.

El fenilacetato es el mejor inhibidor de la hidrólisis del PNA, lo cual parece lógico pues como se había mostrado (tabla 12) la enzima presenta mayor especificidad por este

Tabla 14. Requerimientos estructurales en la inhibición de la hidrólisis de *p*-nitrofenil acetato

INHIBIDOR	30% INHIBICION ^a [M]
Fenilacetato	$9,0 \times 10^{-5}$
<i>p</i> -Nitroacetanilida	$1,5 \times 10^{-3}$
<i>p</i> -Acetoxibenzoato	$2,0 \times 10^{-3}$
1-Acetoxi-1,3-butadieno	$1,1 \times 10^{-2}$
<i>p</i> -Acetamidobenzoato	$1,2 \times 10^{-2}$
<i>p</i> -acetamidofenol	$>0,1^b$
<i>p</i> -nitrofenilformato	$>0,1$
Etil acetato	$>0,1$
Butil acetato	$>0,1$

^a La concentración de enzima y sustrato en el ensayo fue 1×10^{-7} M y 5×10^{-4} M, respectivamente. La concentración final de acetonitrilo empleada en el ensayo fue 1% (v/v).

^b No se detectó inhibición a una concentración de 0,1 M.

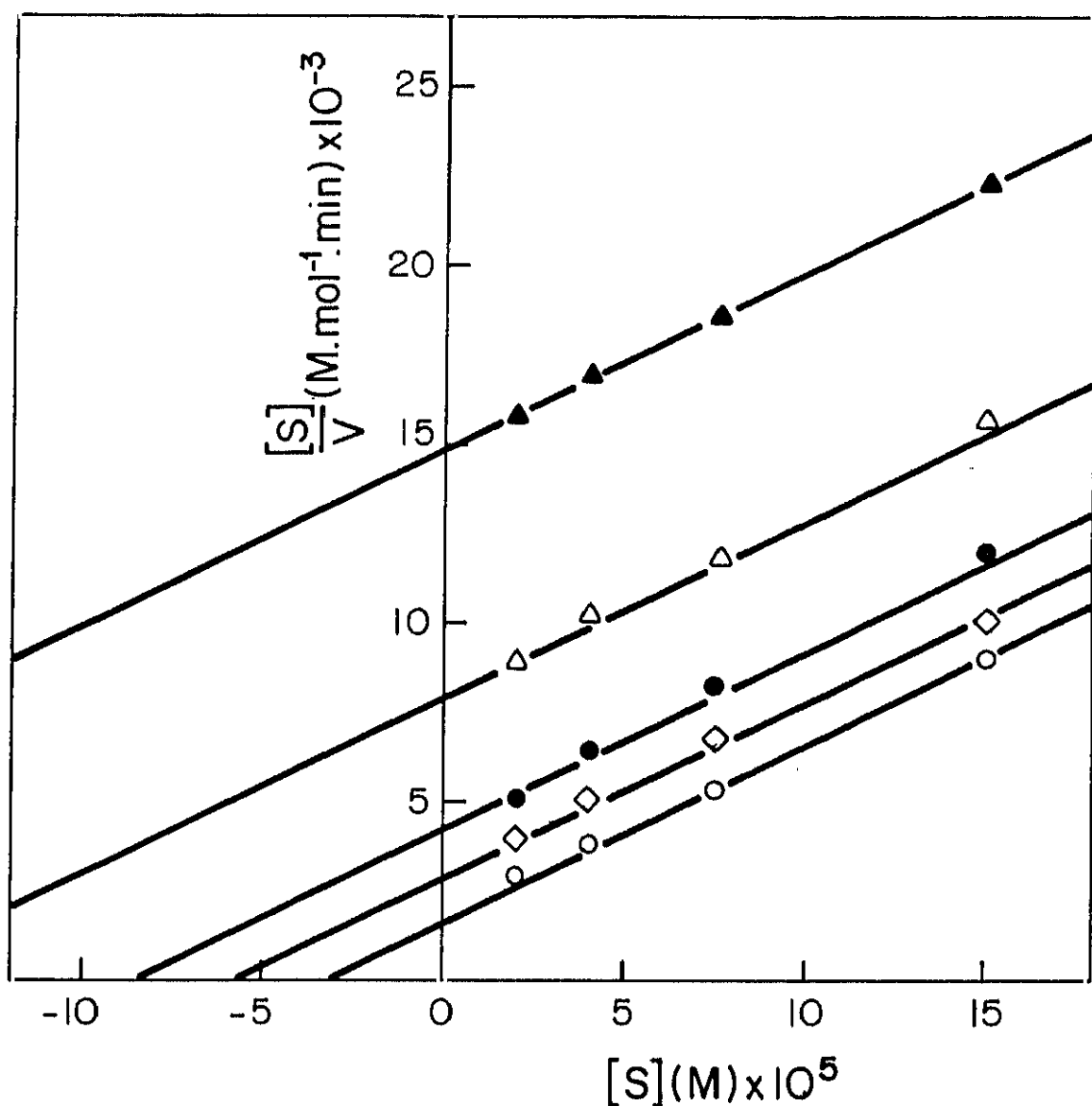


Figura 21. Inhibición competitiva de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato por FA. Las velocidades iniciales de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato fueron calculadas utilizando concentraciones de sustrato no saturantes. El ensayo fue realizado en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 a 25 °C, en presencia de 0,5 % AcN (v/v). Los datos experimentales se analizaron conforme a la representación de Hanes-Woolf (Segel, 1975). La concentración utilizada de PGA fue de $2,3 \times 10^{-6}$ M. Las concentraciones de FA fueron: (o) control sin FA, (\diamond) $2,2 \times 10^{-4}$ M, (\bullet) $4,5 \times 10^{-4}$ M, (Δ) $1,3 \times 10^{-3}$ M, (\blacktriangle) $2,2 \times 10^{-3}$ M.

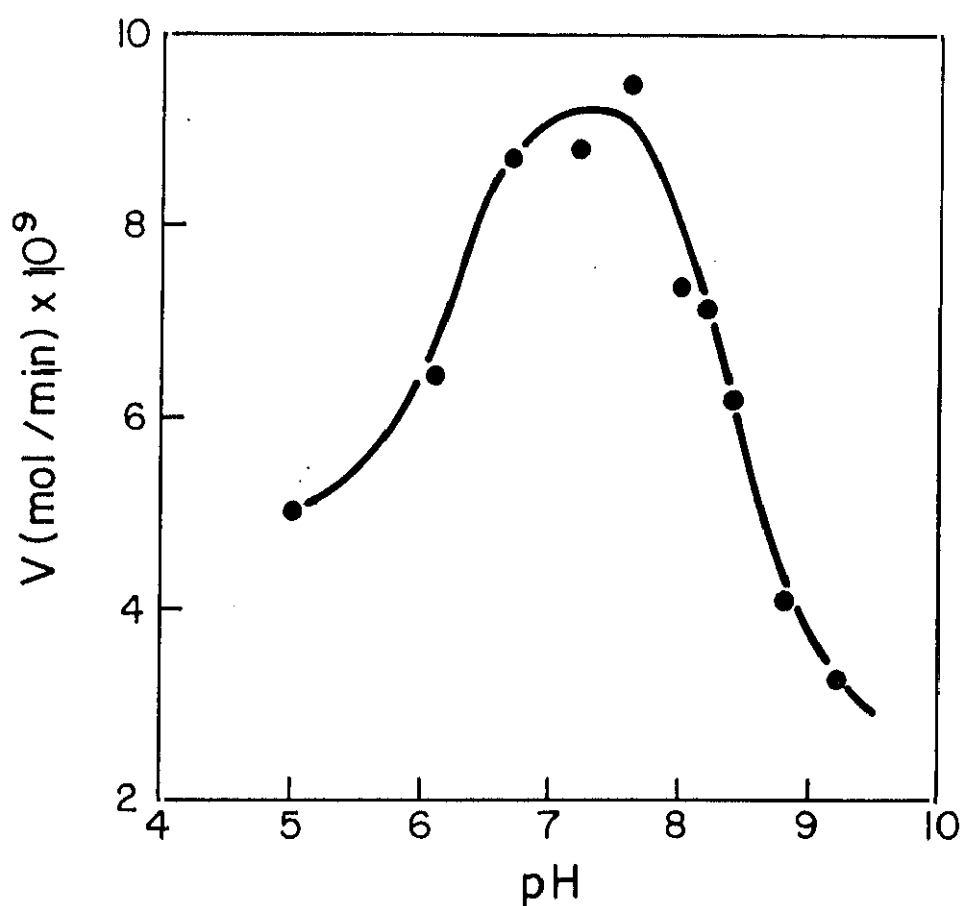


Figura 22. Perfil de pH de la hidrólisis de PNA por la PGA. El ensayo se realizó en los siguientes tampones: tampón acetato 100 mM entre pH 5,0 y 6,0; tampón fosfato 100 mM entre pH 6,0 y 8,0 y tampón Tris-HCl 100 mM entre pH 8,0 y 9,0 a 25 °C. Las concentraciones de enzima y sustrato fueron de $1,6 \times 10^{-6}$ M y 2×10^{-3} M, respectivamente. El porcentaje final de AcN utilizado fue del 2 %.

compuesto que por el PNA. Los compuestos que a continuación presentan un mayor grado de inhibición son la *p*-nitroacetanilida y el ácido *p*-acetoxibenzoico (tabla 14). El grado de acidez de la cadena de acilo podría afectar la unión del sustrato al centro activo (Dale y col. 1986). El *p*-acetamidobenzoato ejerce una inhibición menor, del mismo orden que el 1-acetoxi-1,3-butadieno. Este último compuesto es capaz de acceder al centro activo debido posiblemente a su carácter hidrofóbico. Aquellos compuestos como el etil acetato o el butil acetato, de naturaleza no hidrofóbica, no fueron capaces de inhibir la hidrólisis del PNA. El *p*-nitrofenilacetato no fue capaz de mostrar inhibición, al igual que tampoco se detectó su hidrólisis (tabla 12). Este resultado podría indicar que la estructura mínima que es capaz de unirse al centro activo de la PGA es un acetato.

2.2.5. Determinación de los parámetros cinéticos en el estado estacionario. Efecto del acetonitrilo en la catálisis.

Los ésteres de *p*-nitrofenol presentan una baja solubilidad en agua, por lo que se ha empleado el acetonitrilo (AcN) para solubilizarlos. La capacidad perturbadora de la actividad enzimática de un disolvente orgánico depende de los efectos que produce sobre las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de solvatación, así como de la naturaleza química de las especies que intervienen en los equilibrios de ionización esenciales en la actividad catalítica. La disminución de la constante dieléctrica del medio acuoso por la adición de un disolvente orgánico miscible supone una desestabilización relativa de las especies con carga frente a las especies neutras, fenómeno que puede alterar la actividad enzimática y por tanto debe ser investigado.

Se ha estudiado la influencia del AcN en la reacción de hidrólisis de PNA por la PGA. Como puede verse en la figura 23, la PGA en presencia de AcN 0,5 % (v/v) mantiene un 98 % de la actividad, disminuyendo hasta un 84 % con AcN 1 %. El porcentaje mínimo de AcN empleado ha sido de 0,1 %, haciendo corresponder con esta concentración el 100 % de actividad. La caída más drástica de actividad se produce entre el 1 % y el 5 %. Por este motivo se han empleado en todos los ensayos un porcentaje de 0,5 % ó 1 % de AcN.

En la hidrólisis del PNA por la α -quimiotripsina, se ha comprobado que la velocidad máxima del proceso es independiente del disolvente orgánico, mientras que la K_M es muy sensible a los cambios en los porcentajes de éste (Applewhite y col., 1958; Kezdy y Bender, 1962). Para determinar el efecto del AcN sobre la actividad de la PGA durante la hidrólisis de PNA y PNP, se calcularon los parámetros cinéticos en tres diferentes concentraciones: 0,4 %, 1,0 % y 5 %. (tabla 15). Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados de Kezdy y Bender (1962) para la α -quimiotripsina. Es decir, hay una mayor influencia del porcentaje de AcN sobre la K_M que sobre la k_{cat} tanto en la hidrólisis de PNA como del PNP, aunque la influencia sobre la hidrólisis del PNA es mayor.

Tabla 15. Parámetros cinéticos de la PGA nativa en estado estacionario.

SUSTRATO ^a	K_M (M)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m
Penicillin G ^b	$(1,8 \pm 0,8) \times 10^{-5}$	$56,0 \pm 0,3$	$3,1 \times 10^6$
NIPAB (0.5% AcN)	$(1,1 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$27,2 \pm 0,1$	$2,3 \times 10^6$
<i>p</i> -Nitrofenilfenilacetato (1,0% AcN)	$(5,7 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$81,6 \pm 0,5$	$1,4 \times 10^6$
<i>p</i> -Nitrofenilacetato (0,4% AcN)	$(5,0 \pm 0,4) \times 10^{-6}$	$2,0 \pm 0,07$	$4,6 \times 10^5$
<i>p</i> -Nitrofenilacetato (1,0% AcN)	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$1,0 \pm 0,08$	$4,6 \times 10^4$
<i>p</i> -Nitrofenilacetato (5,0% AcN)	$(1,5 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$0,7 \pm 0,02$	$4,5 \times 10^4$
<i>p</i> -Nitrofenilpropionato (0,4% AcN)	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$3,9 \pm 0,3$	$2,2 \times 10^4$
<i>p</i> -Nitrofenilpropionato (1,0% AcN)	$(1,7 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$3,9 \pm 0,1$	$2,2 \times 10^4$
<i>p</i> -Nitrofenilpropionato (5,0% AcN)	$(1,5 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$3,0 \pm 0,2$	$2,5 \times 10^3$

^a Se indica la concentración final de acetonitrilo (AcN) empleada en el ensayo. Los datos se presentan con el valor principal \pm la desviación standard calculada a partir de tres ensayos independientes para cada uno, como mínimo.

^b Datos obtenidos de Prieto y col., (1990).

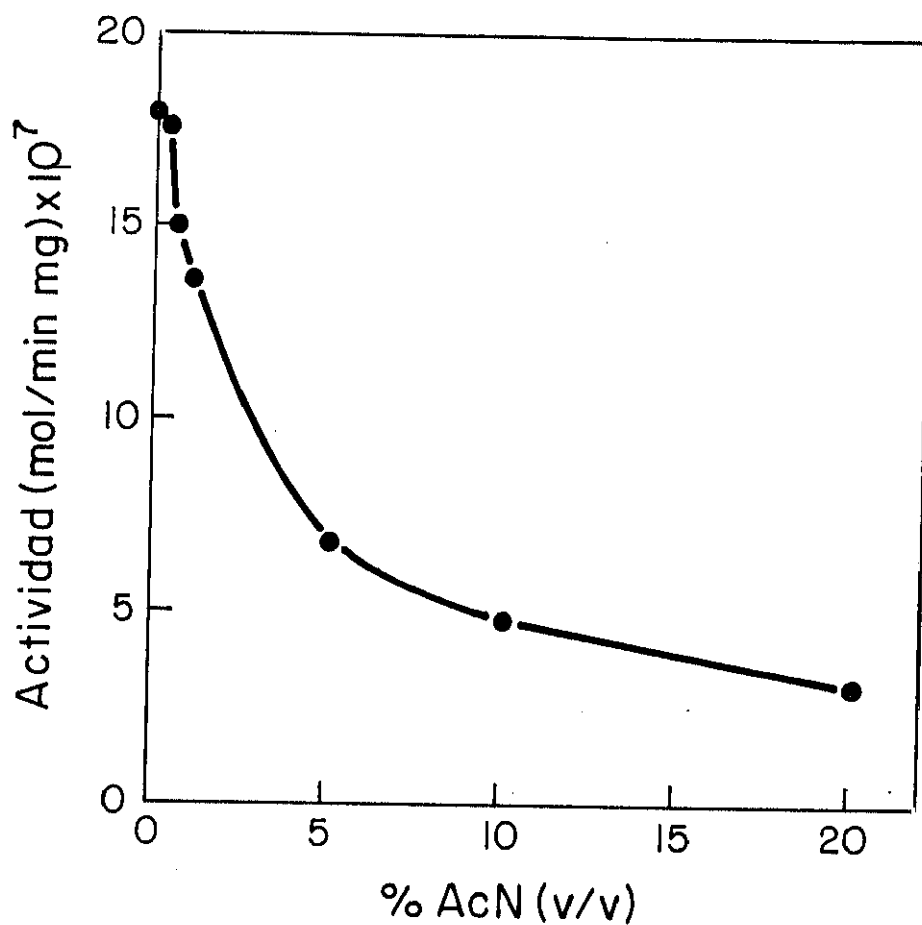


Figura 23. Influencia del AcN en la reacción de hidrólisis de PNA por la PGA. El ensayo fue realizado en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 a 22 °C. Las concentraciones de enzima y sustrato fueron $6,2 \times 10^{-8}$ M y 5×10^{-5} M, respectivamente.

También se ha analizado la estabilidad de la enzima frente al tiempo en presencia de AcN (figura 24). Los resultados obtenidos reflejan la gran estabilidad de la enzima. En una hora con 1 % y con 5 % de AcN (v/v) se mantiene un 99 % de la actividad, disminuyendo hasta un 80 % en 3 horas. Dado que los ensayos de actividad realizados en presencia de AcN no han excedido de minutos, se puede afirmar que la enzima no se ha desestabilizado en el tiempo del ensayo por la presencia del disolvente orgánico empleado, aun admitiendo que la presencia del mismo altera de por sí la actividad.

Una vez determinado que el PNA sería el mejor sustrato para proceder al estudio de cinéticas rápidas, se calcularon también las constantes cinéticas en estado estacionario para la ADL, con objeto de estudiar su comportamiento cinético en el estado pre-estacionario. Los resultados se muestran en la tabla 16 y nos permiten concluir que la unión de este tipo de sustratos a la enzima mutante es muy similar a la que presenta la enzima nativa, aunque la catálisis se produce mucho más lentamente. En este caso también el PNA parece el sustrato más indicado para los estudios en el equipo de flujo detenido, puesto que el *p*-nitrofenilpropionato, con una mayor K_M , y una baja solubilidad no permite trabajar en condiciones de acilación (ver Materiales y Métodos).

2.3. ESTUDIO CINETICO EN EL ESTADO PRE-ESTACIONARIO.

Se han estudiado las cinéticas en el estado pre-estacionario de la hidrólisis del PNA por la PGA nativa y el mutante ADL, con objeto de caracterizar las constantes de acilación y desacilación del intermedio covalente acil-enzima formado durante la catálisis.

2.3.1. Determinación del tiempo muerto del equipo de flujo detenido.

Se denomina tiempo muerto al tiempo que transcurre desde que el contenido de las jeringas pasa a la cámara de mezcla y comienza a detectarse la reacción. El tiempo muerto del equipo Hi-Tech SF-3L utilizado fue de 1,1 ms, tal y como se calculó a partir de la pendiente de la recta que se obtiene de representar el logaritmo de la amplitud frente a la constante de decaimiento, de la reacción de amortiguación del 2,6-diclorofenol-indofenol con el ácido ascórbico (figura 25).

2.3.2. Optimización de las condiciones de reacción.

Una vez seleccionado el *p*-nitrofenilacetato como el sustrato más adecuado para realizar el estudio en el estado pre-estacionario, se deben elegir las condiciones experimentales adecuadas para llevarlo a cabo.

Tabla 16. Parámetros cinéticos en estado estacionario del mutante ADL .

SUSTRATO ^a	K_M (M)	$k_{cat.}(s^{-1})$	$k_{cat.}/K_m$
NIPAB (0.5% AcN)	$(2,2 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$28,0 \pm 0,2$	$1,3 \times 10^6$
<i>p</i> -Nitrofenilfenilacetato (1.0% AcN)	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$38,9 \pm 0,5$	$3,7 \times 10^6$
<i>p</i> -Nitrofenilacetato (1.0% AcN)	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$0,060 \pm 0,008$	$5,0 \times 10^3$
<i>p</i> -Nitrofenilpropionato (1.0% AcN)	$(1,8 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$0,46 \pm 0,1$	$2,5 \times 10^3$

a. Se indica la concentración final de acetonitrilo (AcN) empleada en el ensayo. Los datos se presentan con el valor principal \pm la desviación estándar calculada a partir de tres ensayos independientes por cada uno, como mínimo.

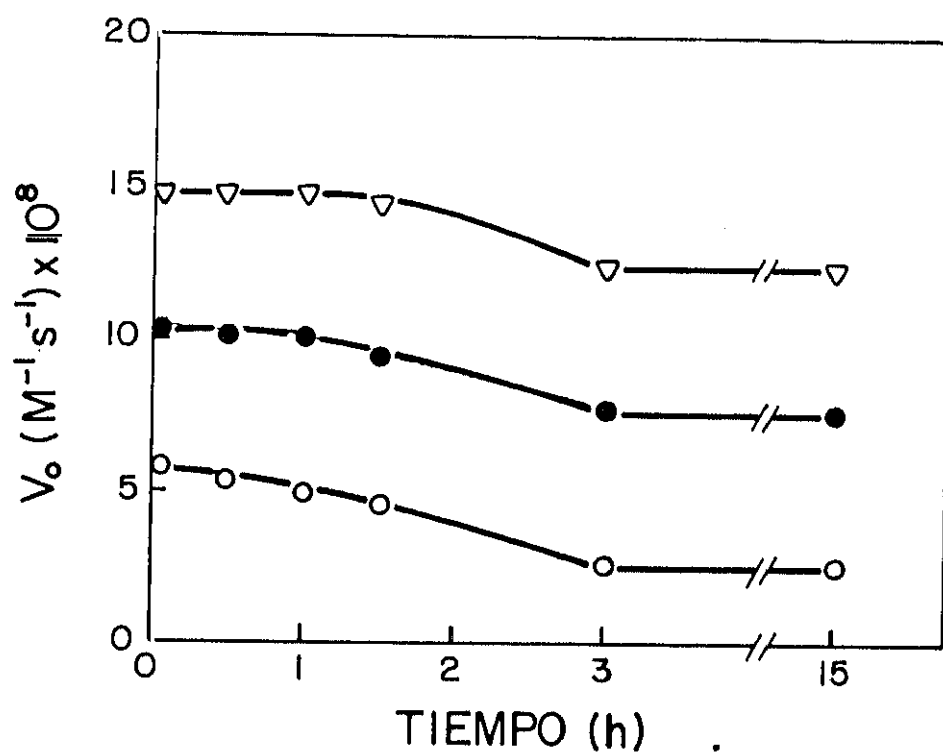


Figura 24. Estabilidad de la PGA frente al tiempo en presencia de AcN. Se ha valorado la hidrólisis de PNA en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 a 22 °C. Las concentraciones finales de enzima y sustrato en el ensayo fueron de $9,5 \times 10^{-8}$ M y $2,5 \times 10^{-4}$ M, respectivamente. Los porcentajes de AcN (v/v) empleados fueron: (o) 1 %, (o) 5 %, (▽) 20 %.

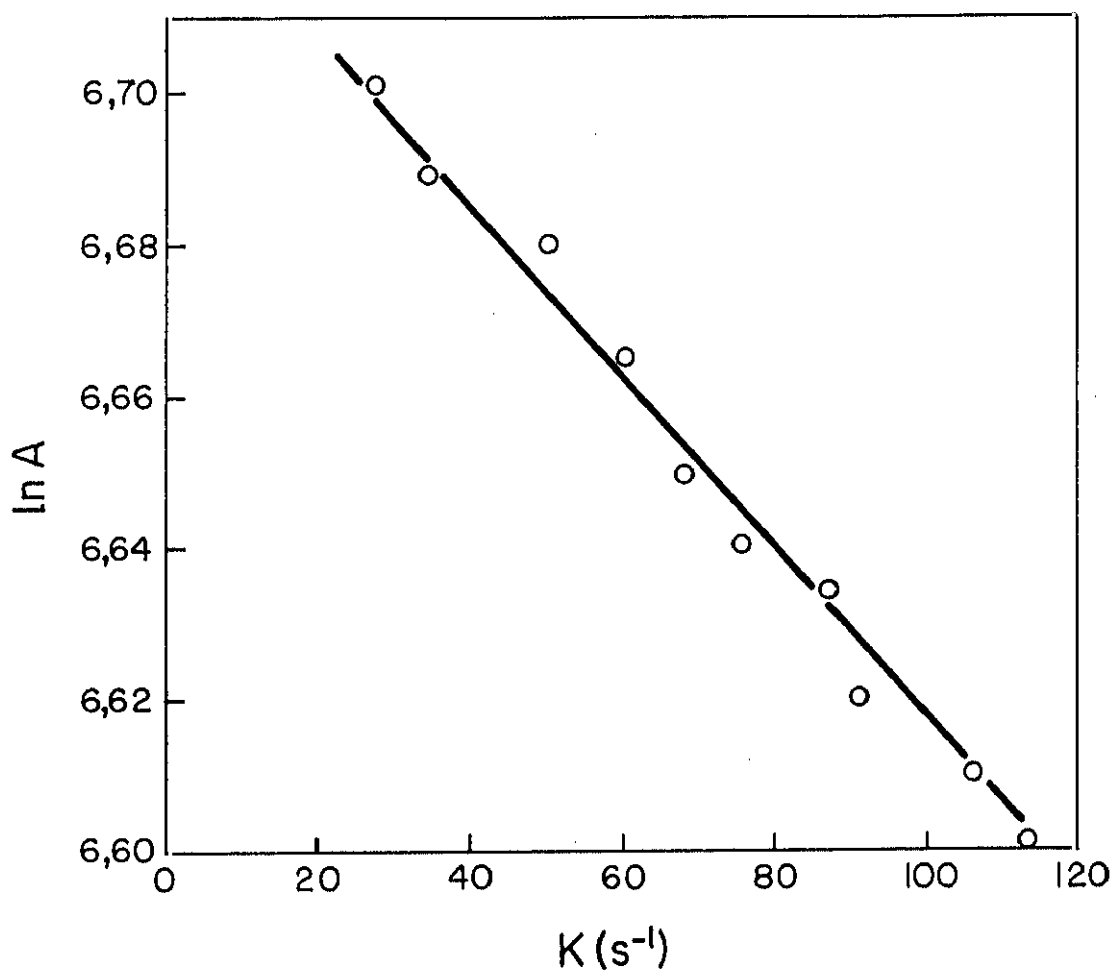


Figura 25. Determinación del tiempo muerto del equipo de flujo detenido. Se utilizaron concentraciones de ácido ascórbico entre 0 y 50 mM y de 0,075 mM de 2,6-diclorofenol-indofenol. La reacción se realizó a 22 °C. La amplitud de la reacción de amortiguación se representa por A, siendo K (s⁻¹) la constante de decaimiento.

El porcentaje de AcN empleado, es uno de los factores a considerar. El análisis de los parámetros cinéticos en diferentes porcentajes de AcN indicó que una concentración del 1 % final (v/v) parecía la más indicada, por los valores de K_M y k_{cat} que presentaban las PGA nativa y mutante.

Para conseguir un 1 % de AcN (v/v) en la cámara de mezcla se plantean dos opciones, utilizar el sustrato disuelto en un 2 % de acetonitrilo y la enzima en su tampón sin AcN, o bien, distribuir un 1 % de AcN en la solución con el sustrato y en la de la enzima. Si bien esta última opción es la que menos problemas de mezcla ocasionaría, cabría la posibilidad de que el disolvente orgánico inactivase e inestabilizase la PGA. El estudio de la estabilidad de la PGA frente a diferentes porcentajes de AcN indicó que la enzima es muy estable, incluso en largos tiempos de incubación (figura 24).

Se ha observado en estudios similares con β -lactamasa, una pérdida de la enzima por adhesión a las conducciones del aparato, que se ha solucionado mediante el empleo de lisozima para saturar los conductos del equipo. La posibilidad de que ocurriera lo mismo durante el estudio de la hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato por la PGA, llevó a investigar el efecto de la lisozima a 1 mg/ml en la reacción. Como no se observó ninguna interferencia en la reacción de hidrólisis se decidió utilizar lisozima para saturar las conducciones.

2.3.3. Cinéticas en el estado pre-estacionario.

Para probar la existencia de un intermedio en el mecanismo de una reacción enzimática se debe detectar y determinar sus constantes de formación y descomposición en estado pre-estacionario, y éstas deben ser consistentes con la actividad de la enzima en estado estacionario. En el caso de las serín-proteasas, las constantes de acilación (k_2) y desacilación (k_3), deben ser, cada una de ellas, mayor o igual a la k_{cat} del proceso global en el estado estacionario.

Al realizar una serie de reacciones preliminares en el equipo de flujo detenido, se observó la formación de un "burst" durante la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato tanto con la PGA nativa como con la mutante, aunque en este último caso el proceso era más lento como cabía esperar tras conocer los parámetros cinéticos en el estado estacionario (tablas 15 y 16). Para determinar con exactitud que se estaba procediendo de un modo correcto y que las cinéticas rápidas observadas se correspondían realmente con el mecanismo de reacción propuesto y no con un artefacto, se procedió a realizar los estudios que se detallan a continuación.

Todas las concentraciones que se van a describir en los siguientes apartados corresponden a la concentración final en la cámara de mezcla del equipo de flujo detenido.

2.3.3.1. Dependencia de la amplitud del "burst" de la concentración de enzima.

La amplitud del "burst" debe ser igual a la concentración de enzima siempre que se trabaje en condiciones de acilación. De hecho este es un método que también se utiliza para la titulación de centros activos (Fersht, 1985). Por lo tanto, se determinó la magnitud del "burst" con diferentes concentraciones de enzima (figura 26). De los resultados obtenidos se puede concluir que la relación entre la magnitud del "burst" y la concentración de enzima es lineal tanto con PGA como con ADL, y que las cinéticas observadas se corresponden con las que presentan enzimas con un mecanismo cinético similar.

2.3.3.2. Dependencia de la amplitud del "burst" de la concentración de sustrato.

Si se mantiene constante la concentración de enzima y se varía la concentración de sustrato, siempre que se cumplan las condiciones de acilación, la amplitud del "burst" debe mantenerse invariable. Con objeto de comprobar que estamos en el estado pre-estacionario de la reacción, se ensayaron diferentes concentraciones de sustrato, PNA (figura 27).

Los resultados confirman la invariabilidad de la amplitud del "burst" con la concentración de sustrato con ambas proteínas.

2.3.3.3. Determinación de las constantes de acilación y desacilación.

Los valores de la constante de velocidad en estado estacionario, calculados a partir de las cinéticas realizadas en el equipo de flujo detenido, se mantienen constantes frente a la concentración de sustrato (figura 28) al igual que ocurría con la amplitud del "burst" (figura 27)

Para calcular los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis de PNA por la PGA nativa y mutante, a través del análisis cinético en el estado pre-estacionario, se ensayaron diferentes concentraciones de sustrato frente a PGA y a ADL. La representación de $1/b$ frente a $1/[S_0]$ se muestra en la figura 29 y los resultados de las constantes de acilación (k_2), desacilación (k_3) y de unión (K_s) obtenidos a partir del análisis correspondiente se muestran en la tabla 17.

Los resultados indican que en la hidrólisis del sustrato *p*-nitrofenilacetato el proceso de acilación es más rápido que el proceso de desacilación, y por tanto se confirma que la etapa limitante corresponde a la desacilación. Esto se cumple tanto con la enzima nativa como con la mutante, aunque la relación entre las constantes de velocidad (k_2 y k_3) es tres veces mayor para la enzima nativa. La proteína mutante presenta una menor alteración en el proceso de formación del intermedio acilenzima que en su posterior hidrólisis. La mutación Phe360Val, no altera la etapa limitante de la

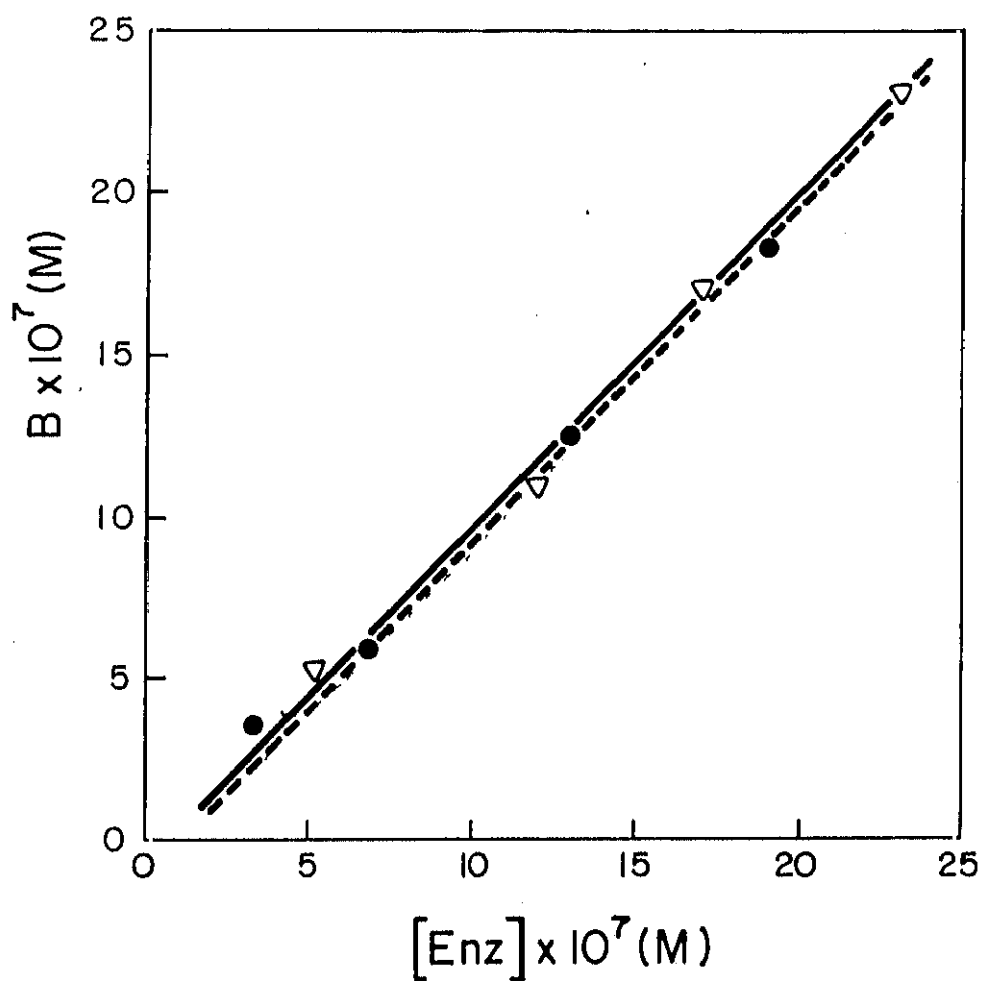


Figura 26. Dependencia de la amplitud del "burst" de la concentración de enzima. Se utilizaron concentraciones de enzima que oscilaron entre $5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ y $1,9 \times 10^{-6} \text{ M}$ para la PGA nativa (o), y desde $5,2 \times 10^{-7} \text{ M}$ a $2,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ para la ADL (∇). La concentración de sustrato fue de $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ y la reacción transcurrió en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5 a 22 °C. B, amplitud del "burst".

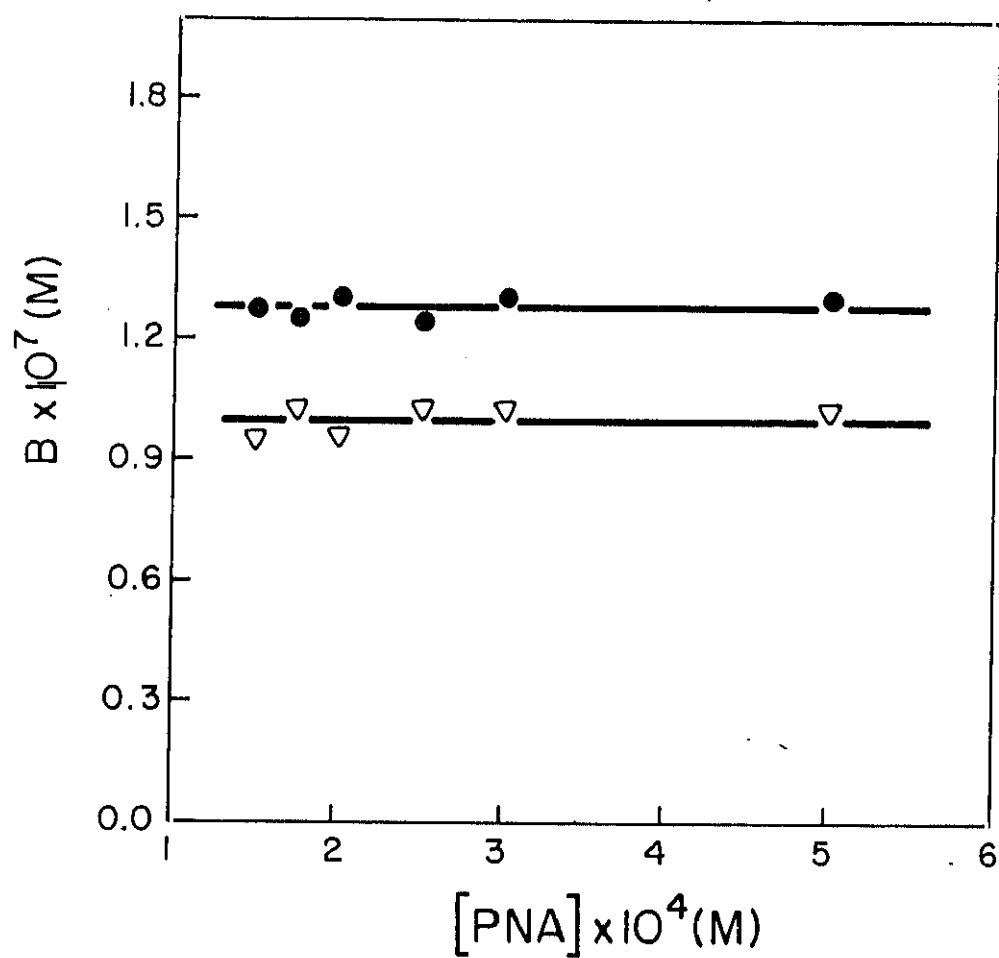


Figura 27. Dependencia de la amplitud del "burst" de la concentración de sustrato. Se emplearon concentraciones de sustrato entre $1,5 \times 10^{-4} M$ y $5 \times 10^{-4} M$, frente a una concentración de PGA nativa de $1,7 \times 10^{-6} M$ (o) y de mutante ADL (▽) $1,2 \times 10^{-6} M$, en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5 a 22 °C. B, amplitud del "burst".

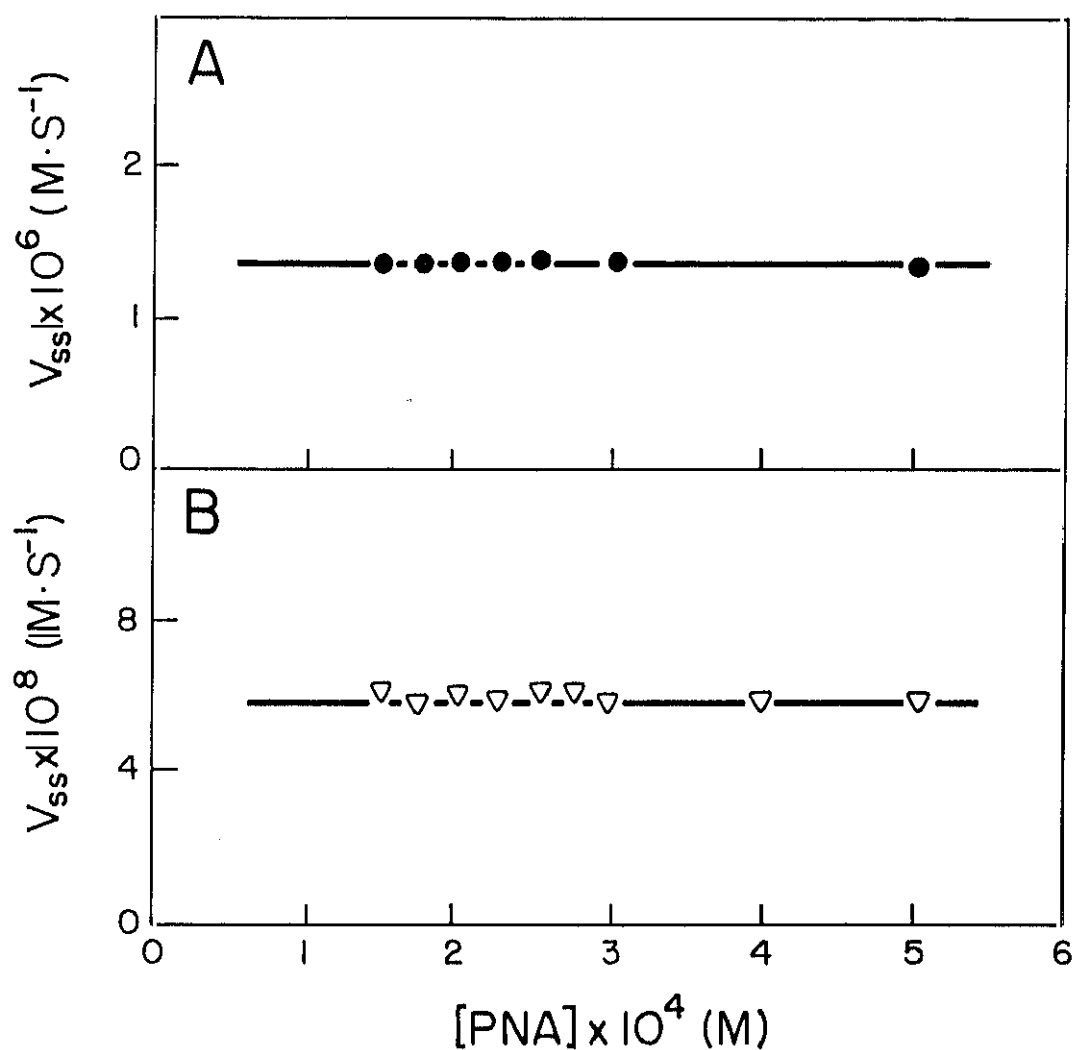


Figura 28. Dependencia de la velocidad de la hidrólisis del PNA con la concentración de sustrato. Las velocidades se han obtenido a partir de las cinéticas realizadas en el equipo de flujo detenido, una vez alcanzado el estado estacionario. Las concentraciones de sustrato empleadas variaron entre $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, con una concentración de PGA nativa de $1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$ (A), y con una concentración de ADL de $1,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (B). Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5 a 22 °C.

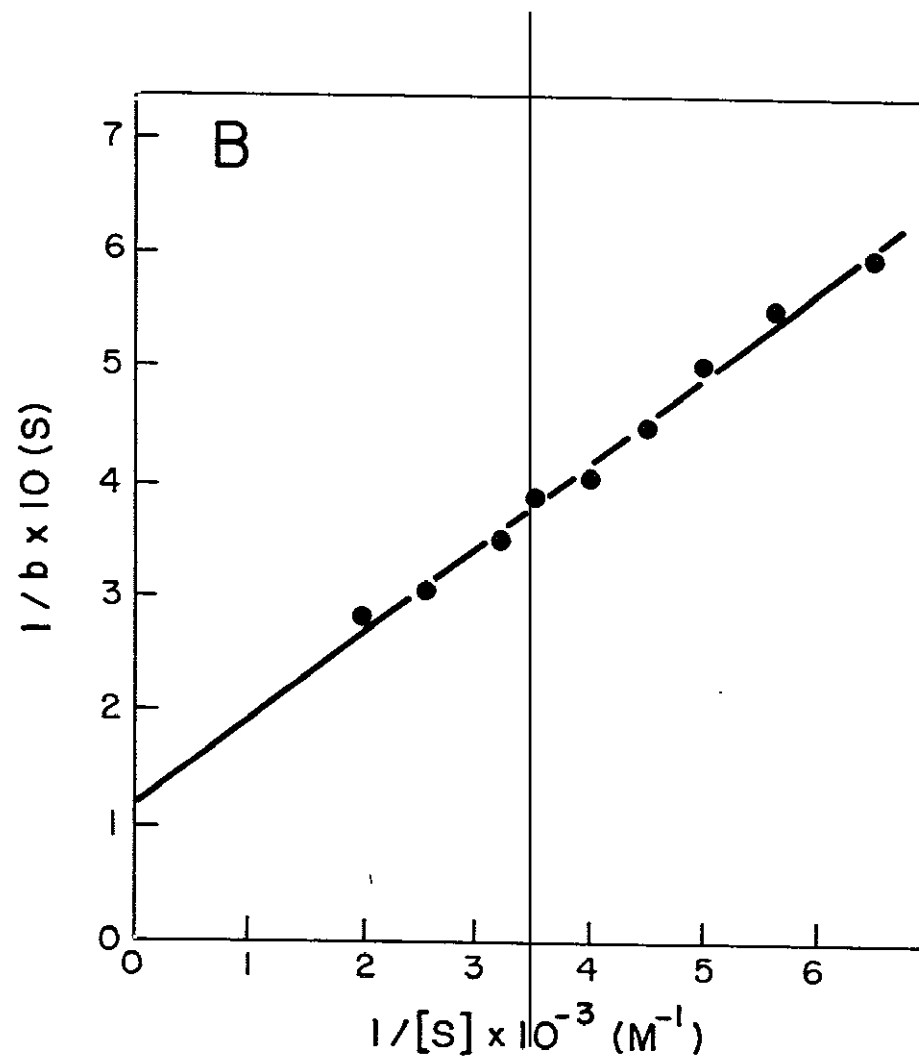
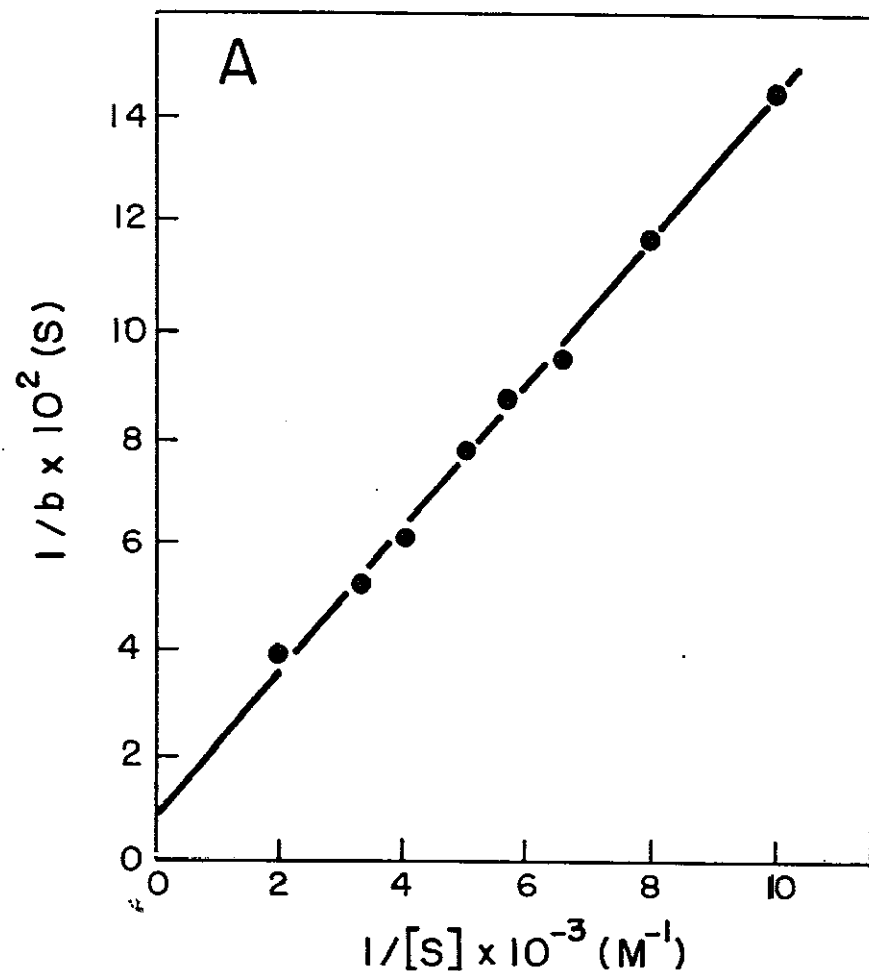


Figura 29. Representación de $1/b$ frente a $1/[S]$. Se utilizaron concentraciones de sustrato entre $1,5 \times 10^{-4}$ M y $5,0 \times 10^{-4}$ M, con una concentración de PGA nativa de $1,7 \times 10^{-6}$ M (A), y con una concentración de ADL de $1,2 \times 10^{-6}$ M (B). Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5 a 22 °C. b, cinética del "burst".

hidrólisis aunque sí influye negativamente sobre la eficiencia catalítica de la enzima. Aunque la mutación no parece afectar significativamente la afinidad de la enzima mutante ADL por los ésteres de *p*-nitrofenol (tablas 16 y 17), la disposición de este tipo de sustratos en el centro catalítico, podría ser diferente respecto de la enzima nativa. Esto dificultaría la accesibilidad al sustrato de los residuos implicados en la catálisis, sobre todo en lo que se refiere a la hidrólisis del intermedio covalente acil-enzima.

2.3.4. Estudios de inhibición en el estado pre-estacionario.

Aunque ya se ha mostrado anteriormente que la inhibición por ácido fenilacético de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato por la PGA de *K. citrophila* es de naturaleza competitiva (figura 21), al igual que para la hidrólisis de penicilina G (Balashingam y col. 1972) no se conoce su efecto directo sobre la constante de acilación o formación del intermedio acil-enzima.

Se ha estudiado la inhibición de la hidrólisis de PNA por la PGA de *K. citrophila* nativa y mutante. El efecto de la inhibición sobre la constante de velocidad del "burst" se muestra en la figura 30 y los valores obtenidos para las constantes de inhibición en la tabla 17.

Tabla 17. Parámetros cinéticos de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato calculados a partir de las cinéticas en estado pre-estacionario.

	k_2 (s ⁻¹) ^a	k_3 (s ⁻¹) ^a	K_s (mM) ^a	k_2/K_s ^a (mM ⁻¹ x s ⁻¹)	K_i ^b (ácido fenilacético) (μM)
PGA	58,0 ± 4,1	0,901 ± 0,140	0,77 ± 0,08	77,0 ± 1,9	177,1 ± 24,0
ADL	9,3 ± 1,8	0,051 ± 0,009	0,84 ± 0,25	11,4 ± 0,8	111,0 ± 15,2

a. Los resultados de la tabla se han obtenido a partir del análisis de las gráficas representadas en la figura 29.

b. La determinación de K_i se ha obtenido a partir de los datos representados en la figura 30.

Se indica el valor principal ± la desviación estándar calculada a partir de tres ensayos independientes, como mínimo.

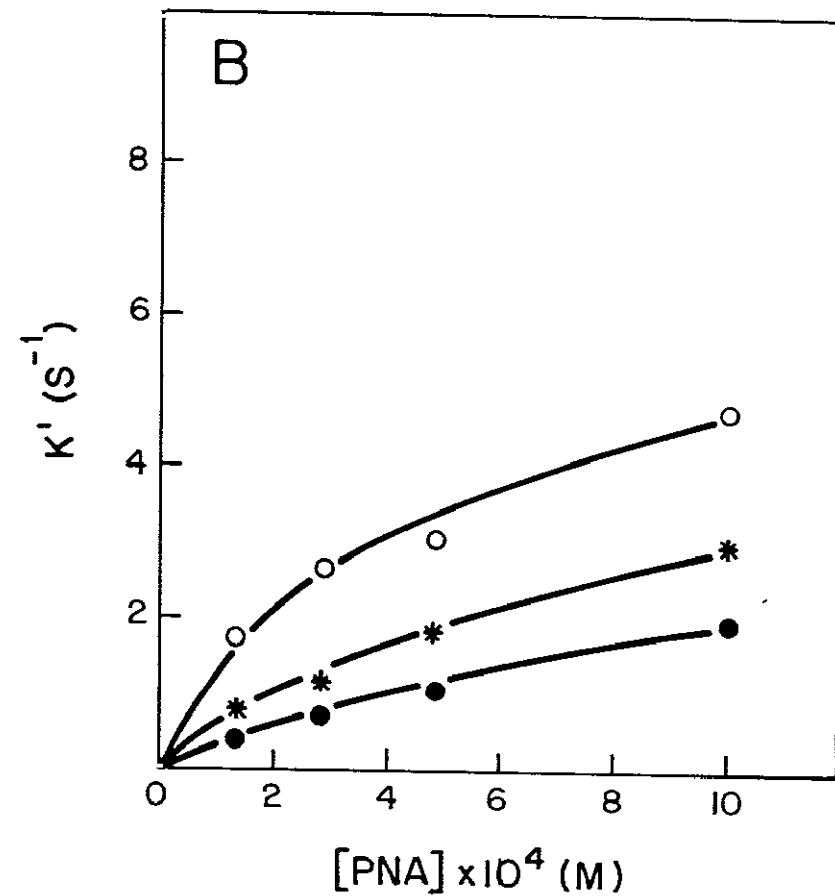
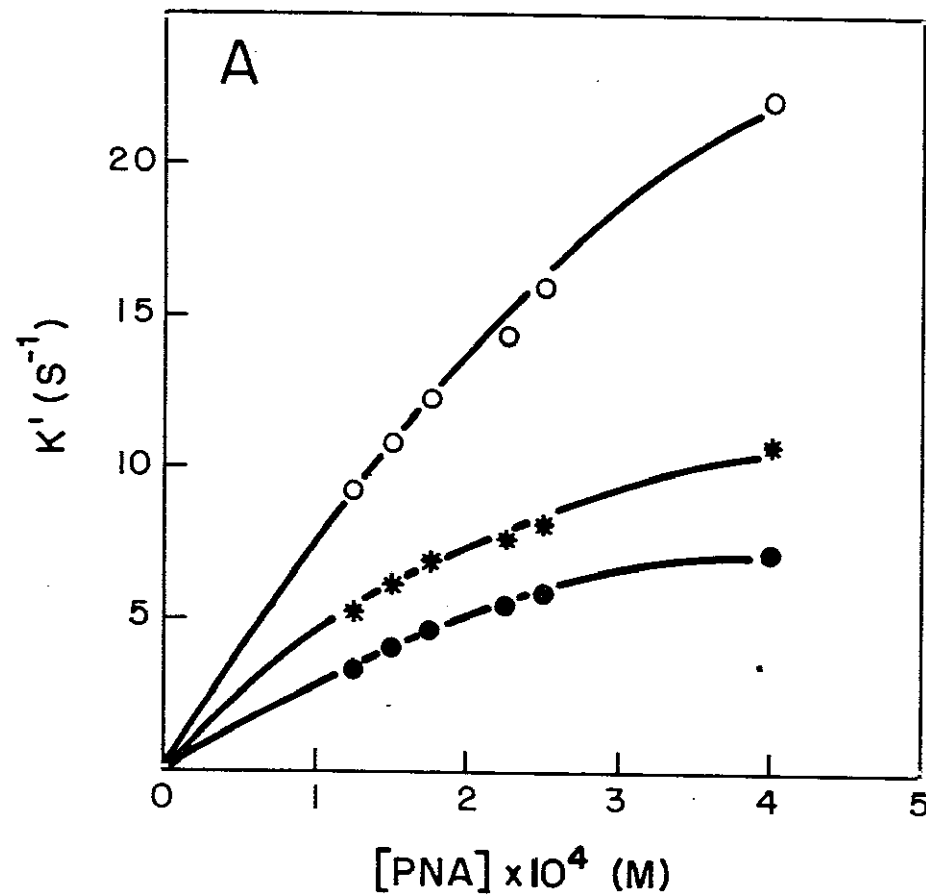


Figura 30. Efecto del FA sobre el "burst". La hidrólisis del PNA se ha llevado a cabo en presencia de dos concentraciones de FA: (o) 5×10^{-4} M, (*) 2×10^{-4} M, siendo (o) el control sin FA. La concentración de PGA fue de $1,7 \times 10^{-6}$ M (A), y la de ADL fue de $1,2 \times 10^{-6}$ M (B). Los ensayos se realizaron en tampón fosfato 100 mM, pH 7,5 a 22 °C. K' , cinética del "burst".

APENDICE: Analisis cinético en el estado pre-estacionario.

Sin pretender detallar la teoría empleada para el análisis cinético en el estado pre-estacionario, se van a indicar a continuación las ecuaciones básicas que han permitido el cálculo de las constantes cinéticas. Para una explicación más detallada recurrir a Gutfreund y Sturtevant (1956a, b), Ouellet y Stewart (1959), Kézdy y Bender (1962) y Bender y col. (1967).

Si se acepta el esquema de la figura 18 como válido y se supone que la acil-enzima está en estado estacionario, un sencillo calculo cinético lleva a la siguiente expresión para la ecuación de velocidad de la reacción:

$$v = [E_0] [S] \frac{[k_2 k_3 / (k_2 + k_3)]}{[K_s k_3 / (k_2 + k_3)] + [S]} \text{ con } K_s = k_1 / k_{-1}$$

que es una ecuación de Michaelis si se considera

$$K_m = K_s (k_3 / k_2 + k_3) \text{ y } k_{cat} = k_2 k_3 / k_2 + k_3$$

Si asumimos: $[S_0] \gg [E_0]$, entonces serán ciertas las siguientes ecuaciones:

$$[E_0] = [E] + [ES] + [ES']$$

$$d[P_1] / dt = k_2 [ES]$$

$$d[P_2] / dt = k_3 [ES']$$

$$d[ES] / dt = k_2 [ES] - k_3 [ES']$$

Considerando que $E + S \rightleftharpoons ES$ es un pre-equilibrio rápido, tenemos:

$$K_s = [E] [S] / [ES]$$

si a partir de aquí se realiza un sencillo proceso de sustituciones entre las ecuaciones anteriores, tras despejar las incognitas adecuadas, se llega a la siguiente ecuación que describe la cinética bifásica de la figura 19:

$$[P_1] = At + B (1 - e^{-bt})$$

Los valores de A, B y b se obtienen experimentalmente a partir de las cinéticas rápidas y corresponden a los parámetros que se indican en la figura 19. El parámetro A corresponde al siguiente término:

$$A = \frac{[(k_2 k_3 / (k_2 + k_3)) [E_0] [S_0]]}{[S_0] + (K_s k_3 / k_2 + k_3)}$$

como esta ecuación tiene la forma de la ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar en:

$$A = k_{\text{cat}} [E_0] [S_0] / [S_0] + K_m(\text{app})$$

cuya recíproca es:

$$1/A = (1/ k_{\text{cat}} [E_0]) + (K_m(\text{app}) / k_{\text{cat}} [E_0] [S_0])$$

Si se trabaja cumpliendo la condición de acilación $[S_0] \gg K_m(\text{app.})$, entonces $A = k_{\text{cat}} [E_0]$, que gráficamente corresponde a la pendiente de la fase lineal.

El parámetro B o amplitud de "burst", se corresponde con el término:

$$B = [E_0] (k_2 / k_2 + k_3)^2 / (1 + (K_m(\text{app}) / [S_0])^2$$

Por lo tanto, si $k_2 \gg k_3$ y $[S_0] \gg K_m(\text{app.})$, condiciones que se cumplen en este tipo de cinéticas, entonces $B = [E_0]$.

Por último, el término "b" viene dado por:

$$b = [(k_2 + k_3) [S_0] + k_3 K_s] / K_s + [S_0]$$

siendo su forma recíproca:

$$1/b = (1/ k_2 + k_3) + (K_s/ k_2 + k_3) 1/ [S_0]$$

El valor experimental de "b" corresponde a la constante de velocidad del "burst" y a partir de la representación gráfica de $1/b$ frente a $1/ [S_0]$ se pueden calcular $(k_2 + k_3)$ y K_s . Se puede considerar k_3 igual a la k_{cat} del proceso de hidrólisis obtenida de las cinéticas previas realizadas en estado estacionario, si se cumple la condición $k_2 \gg k_3$. Pero se puede calcular su valor de una forma más exacta a partir de los resultados obtenidos del análisis en el estado pre-estacionario, como el cociente de la constante velocidad correspondiente a las cinéticas una vez alcanzado el estado estacionario y la amplitud del "burst", que corresponde a la concentración de enzima presente en el ensayo como se ha mostrado previamente (figura 26).

3. REGULACION Y EXPRESION GENICA.

Como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria las PGA presentan unas características muy especiales, permaneciendo sin resolver muchos aspectos de su expresión así como de su papel en el metabolismo celular. Por ejemplo, la PGA se produce como un precursor citoplásmico, que necesita ser transportado al espacio periplásmico y procesado proteolíticamente para alcanzar la conformación catalíticamente activa (Böck y col., 1983a) ya que ninguno de los intermedios del procesamiento tiene actividad (Schumacher y col., 1986). Es destacable la existencia de un endopéptido localizado en el precursor entre ambas subunidades, que debe ser eliminado en el proceso de maduración de la proteína. Otro aspecto interesante de la PGA y sus genes viene marcado por el control que ejercen sobre la actividad PGA diferentes factores, tales como la temperatura, el nivel de oxígeno, la represión catabólica y la inducción por el ácido fenilacético (Kaufmann y Bauer, 1964; Szentirmai, 1964; Vojtisek y Slezac, 1975a y b). La compleja vía de regulación que se requiere para conseguir PGA activa podría reunir elementos reguladores que actuaran a diferentes niveles, por ejemplo, sobre la transcripción del gen *pac*, o sobre el transporte de la PGA y su maduración.

3.1 REGULACION TRANSCRIPCIONAL.

3.1.1. ESTUDIOS DE INDUCCION.

Está bien establecido que la expresión del gen *pac* de *E. coli* es inducida por ácido fenilacético (Mahajan, 1984). Sin embargo, la inducción del gen *pac* de *K. citrophila* por este mismo compuesto no parece estar tan clara. García y Buesa (1986) han determinado que la inducción de la PGA de *K. citrophila* por ácido fenilacético parece depender de la cepa huésped. En ninguno de los casos han encontrado una dependencia estricta de la presencia de ácido fenilacético para conseguir producción de PGA, y aún no se han determinado las bases de este fenómeno.

Con objeto de entender los mecanismos de regulación implicados en la inducción de los genes *pac* de *E. coli* y de *K. citrophila*, así como de establecer las bases moleculares de la regulación de ambos genes, se ha procedido a delimitar si las diferencias existentes entre los mismos, tienen su origen en sus respectivos promotores, o bien si el mecanismo de acción del ácido fenilacético tiene lugar a otro nivel.

3.1.1.1. Análisis de la producción de PGA por *E.coli* y *K. citrophila*.

Antes de comenzar un estudio detallado de la regulación transcripcional del gen *pac*, se realizó un análisis de la influencia del FA en la producción de PGA de las cepas productoras, *E. coli* ATCC 11105 y *K. citrophila* 21285. Asimismo se investigó dicha producción en las cepas recombinantes HB101(pPGA1) y HB01(pYKH5). Los plásmidos pPGA1 y pYKH5 son portadoras de los genes *pac* de *E. coli* y *K. citrophila*, respectivamente (García y Buesa, 1986) (figuras 31 y 32). La producción de PGA por la cepa de *K. citrophila* ATCC 21285 y en el clon HB101(pYKH5) no se afectó en presencia de FA (figura 31). Sin embargo, la cepa de *E. coli* ATCC 11105 y el clon HB101(pPGA1) requirieron FA para producir PGA (figura 32). Estos resultados mostraron que las cepas recombinantes se comportan igual que las cepas productoras frente a la inducción por FA, y por lo tanto, los plásmidos pPGA1 y pYKH5 portarían la región promotora responsable de la regulación por FA.

3.1.1.2. Determinación de la región promotora del gen *pac* de *K. citrophila*.

Anteriormente se había caracterizado la región reguladora del gen *pac* de *E. coli* habiéndose identificado el promotor, el punto de iniciación de la transcripción y posibles zonas reguladoras (Valle y col., 1986; Merino y col., 1992). Sin embargo, la región promotora del gen *pac* de *K. citrophila* permanecía sin determinar. Con el fin de caracterizarla se secuenció la región que precede al codon de iniciación y se comparó con la región equivalente del gen *pac* de *E. coli*. Se secuenciaron 350 nucleótidos y se encontró una gran similitud en los primeros 173 pares de bases (figura 33).

3.1.1.3. Construcción de fusiones génicas.

Se han descrito diferentes vectores que permiten la selección y caracterización de promotores. De entre ellos se han elegido dos para construir fusiones génicas. En primer lugar, el vector pSKS107 que utiliza la β -galactosidasa como marcador enzimático y permite cuantificar la expresión. Este vector presenta la particularidad de utilizar el propio codon de iniciación de la secuencia que se desea estudiar (Casadaban y col., 1983). En segundo lugar, se ha utilizado el vector pKK232-8 que usa la actividad cloranfenicolacetiltransferasa (CAT) como marcador enzimático. En este vector la actividad CAT es regulada por el promotor que se clone, pero utiliza el codon de iniciación del gen *cat* (Brosius y Lupski, 1987).

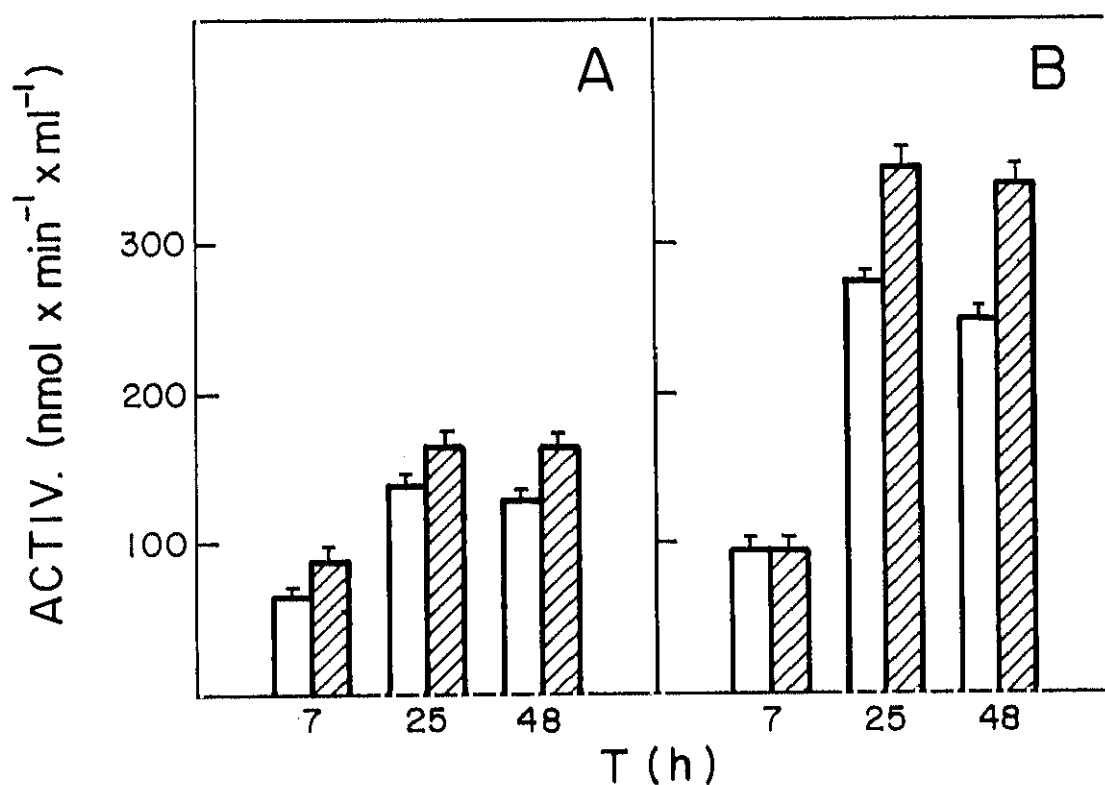


Figura 31. Producción de PGA. A. *K. citrophila* ATCC 21285. B. HB101(pYKH5). La actividad PGA se midió utilizando como sustrato NIPAB. Los cultivos se crecieron a 28 °C en medio LB. Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA.

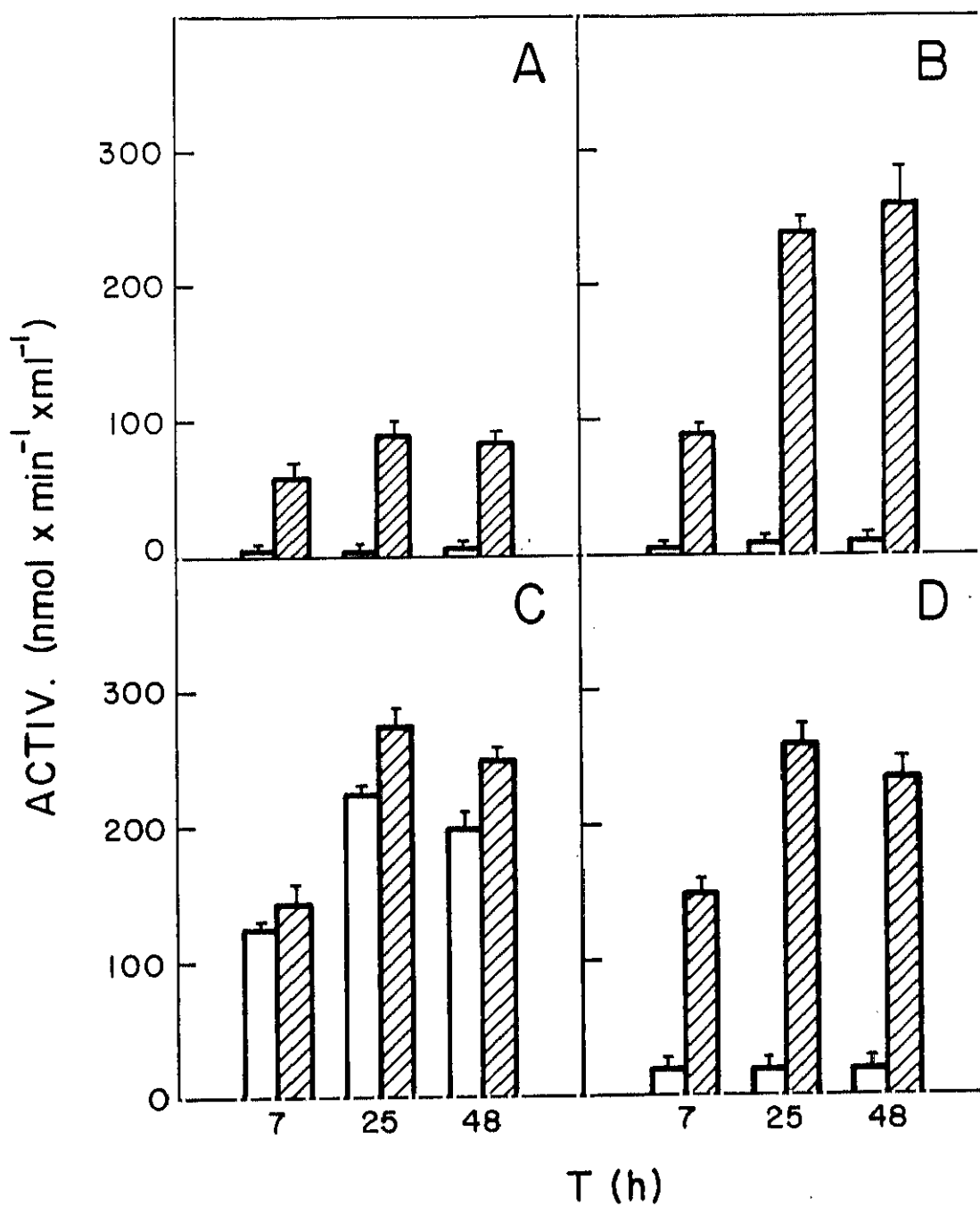


Figura 32. Producción de PGA. A *E. coli* ATCC 11105. B. HB101(pPGA1). C. MC4100(pAJ19). D. HB101(pSKSpac). La actividad PGA se midió utilizando como sustrato NIPAB. Los cultivos se crecieron a 28 °C en medio LB. Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA.

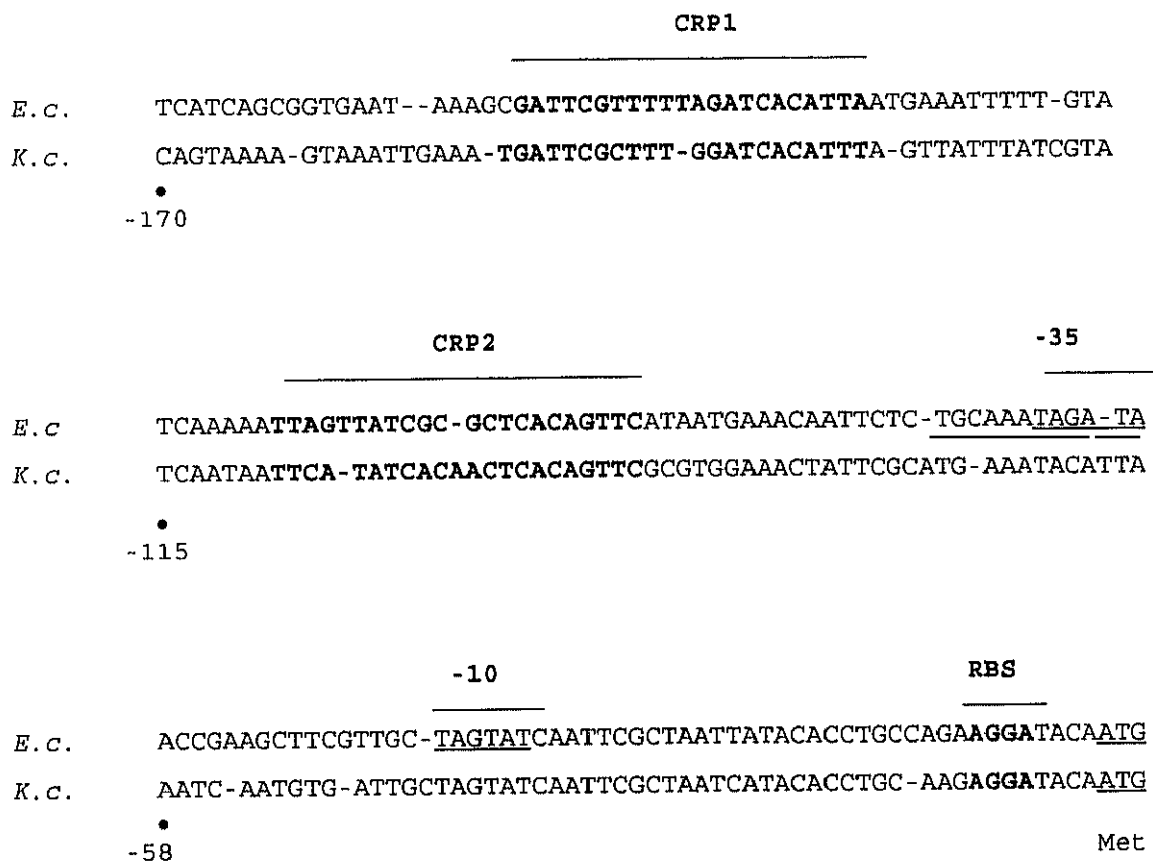


Figura 33. Comparación de la secuencia de nucleótidos de la región reguladora del gen *pac* de *E. coli* (*E.c.*) y de *K. citrophila* (*K.c.*). Las secuencias se obtuvieron por secuenciación de los plásmidos pPGA1 y pYKD59, respectivamente. Se indican dos posibles sitios de unión de CRP, y las regiones promotoras propuestas por Valle y col. (1986).

Se han construido fusiones génicas con la región reguladora propuesta para el gen *pac* de *E. coli* y con su región homóloga en *K. citrophila* para poder comparar de forma precisa el control que ejercen cada una de ellas sobre la expresión (figura 34). Para realizar las construcciones se han utilizado únicamente las regiones conservadas de los genes de *K. citrophila* y de *E. coli*, incluyendo su propio ATG, amplificadas mediante PCR (170 pb para *E. coli* y 173 pb para *K. citrophila*).

Se han obtenido las fusiones de la región reguladora del gen *pac* de *K. citrophila* con los vectores: pSKS107 y pKK232-8 (figura 34A). Respecto de la región reguladora del gen *pac* de *E. coli* se ha conseguido la fusión de esta región al vector pSKS107, pero no al vector pKK232-8 (figura 34 B) debido a la estrategia seguida en la clonación. Asimismo, se ha utilizado un sitio de restricción *HindIII* presente en la secuencia promotora del gen *pac* de *E. coli* para obtener fusiones donde no apareciese la región -10 propuesta por Valle y col. (1986) (pKKE21). También se han obtenido fusiones donde esta región aparece invertida respecto a su localización en el genoma (pKKE18). Es importante resaltar que la exactitud de las construcciones fue comprobada mediante secuenciación.

3.1.1.4. Estudios de inducción por ácido fenilacético.

Con las fusiones de β -galactosidasa mencionadas en el apartado anterior se transformaron las cepas de *E. coli* MC1116 y MC4100, mientras que para las fusiones con CAT se emplearon las cepas de *E. coli* HB101 y MC4100.

Los estudios de inducción realizados con las fusiones de β -galactosidasa (figuras 35A y 36A) mostraron el mismo comportamiento observado anteriormente con el gen *pac* nativo (figuras 31 y 32). Los niveles de β -galactosidasa, aumentaron en presencia de ácido fenilacético (FA) sólo en el caso de la fusión que contiene la región reguladora de *E. coli* (figura 36A). Estos resultados demuestran que los elementos reguladores responsables de la inducción por FA están presentes en la construcción química.

Asimismo se ha llevado a cabo el diseño de la construcción génica pSKSPAC (figura 37). En dicha construcción se ha puesto al gen *pac* de *E. coli* bajo el control de la región reguladora utilizada para construir las fusiones (figura 33), con objeto de confirmar que dicha región es capaz de reproducir el patrón de regulación observado anteriormente (figura 32A y B). En la figura 32D se muestra como el clon HB101 (pSKSPAC) se comporta frente a FA del modo previsto.

Los estudios realizados con las fusiones CAT se limitaron en este punto a la fusión pKKK22, portadora de la fusión génica con la región reguladora del gen *pac* de *K. citrophila* (figura 38). La producción de CAT no se incrementó en presencia de FA. Se estudió la posible influencia de la cepa en la inducción, analizando la producción en *E. coli* HB101 y MC4100. El resultado obtenido con ambas cepas fue muy similar, no

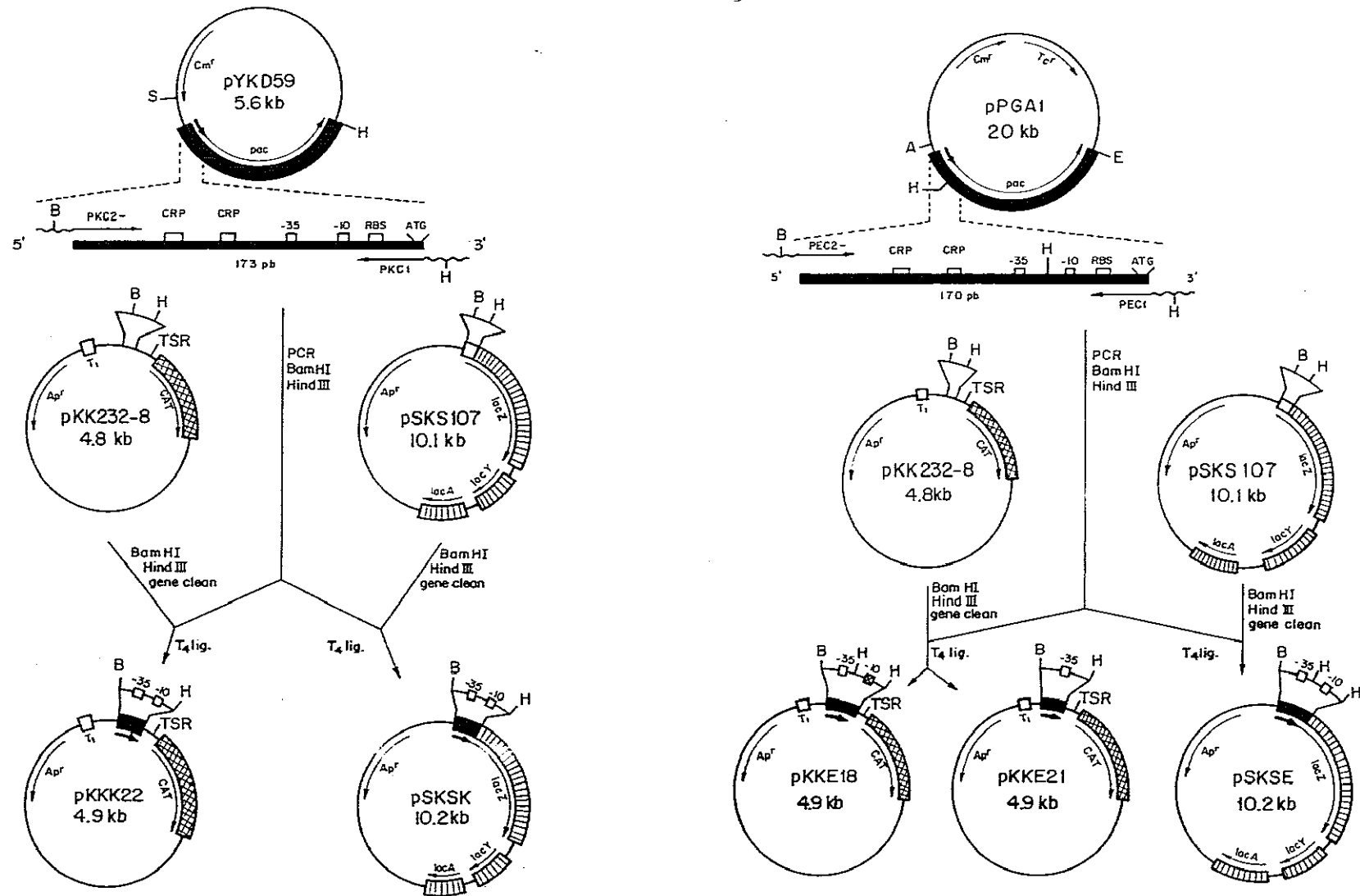


Figura 34. Construcción de fusiones génicas. Los círculos indican los plásmidos. Las cajas en negro representan: **A.** el gen *pac* de *K. citrophila* y su secuencia promotora; **B.** el gen *pac* de *E. coli* con su promotor. Las cajas rayadas representan el operon *lac* que codifica por la β -galactosidasa y las cajas con una trama indican el gen *cat* que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa. Se han señalado los sitios de restricción más significativos. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sca*I. T4 lig, DNA ligasa del fago T4. La amplificación por PCR se realizó siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. TSR, sitios de terminación de la traducción situados en las tres fases de lectura. Ap, ampicilina; Cm, cloranfenicol. -10 y -35, secuencias -10 y -35 del promotor del gen *pac* de *K. citrophila*. CRP, sitio del unión del complejo CRP-cAMP; RBS, sitio de unión al ribosoma; ATG, codon de iniciación de la traducción.

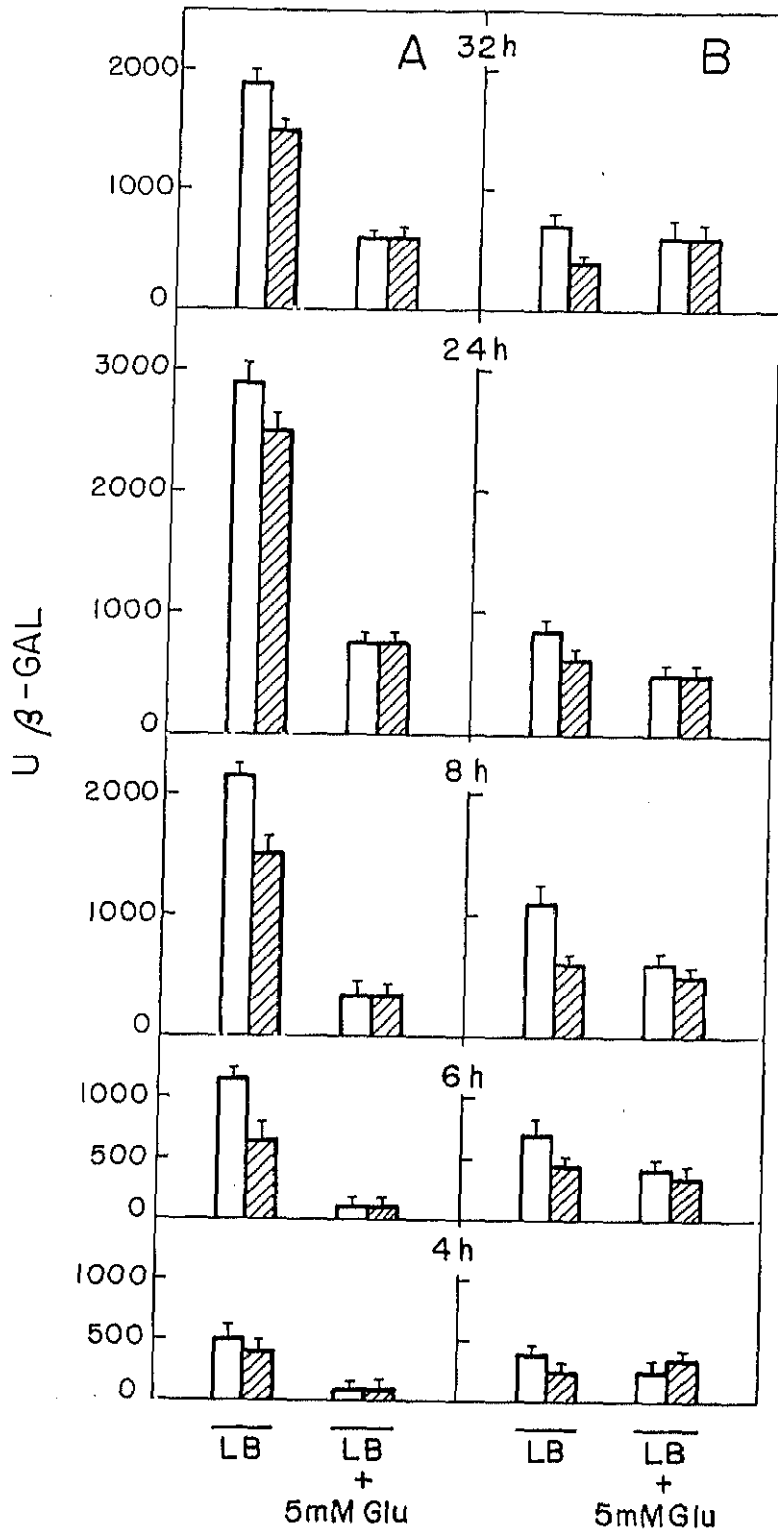


Figura 35. Producción de actividad β-galactosidasa. Expresión de la fusión génica pSKSK que porta el promotor del gen *pac* de *K. citrophila* unido al gen *lacZ*. A. MC4100(pSKSK) B. SBS688(pSKSK). En ambos casos se utiliza el medio LB en ausencia o presencia de glucosa 5 mM. Los cultivos se crecieron a 28 °C ensayando la actividad a los tiempos que se indican. U β-GAL, unidades de actividad β-galactosidasa (ver Materiales y Métodos). Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA.

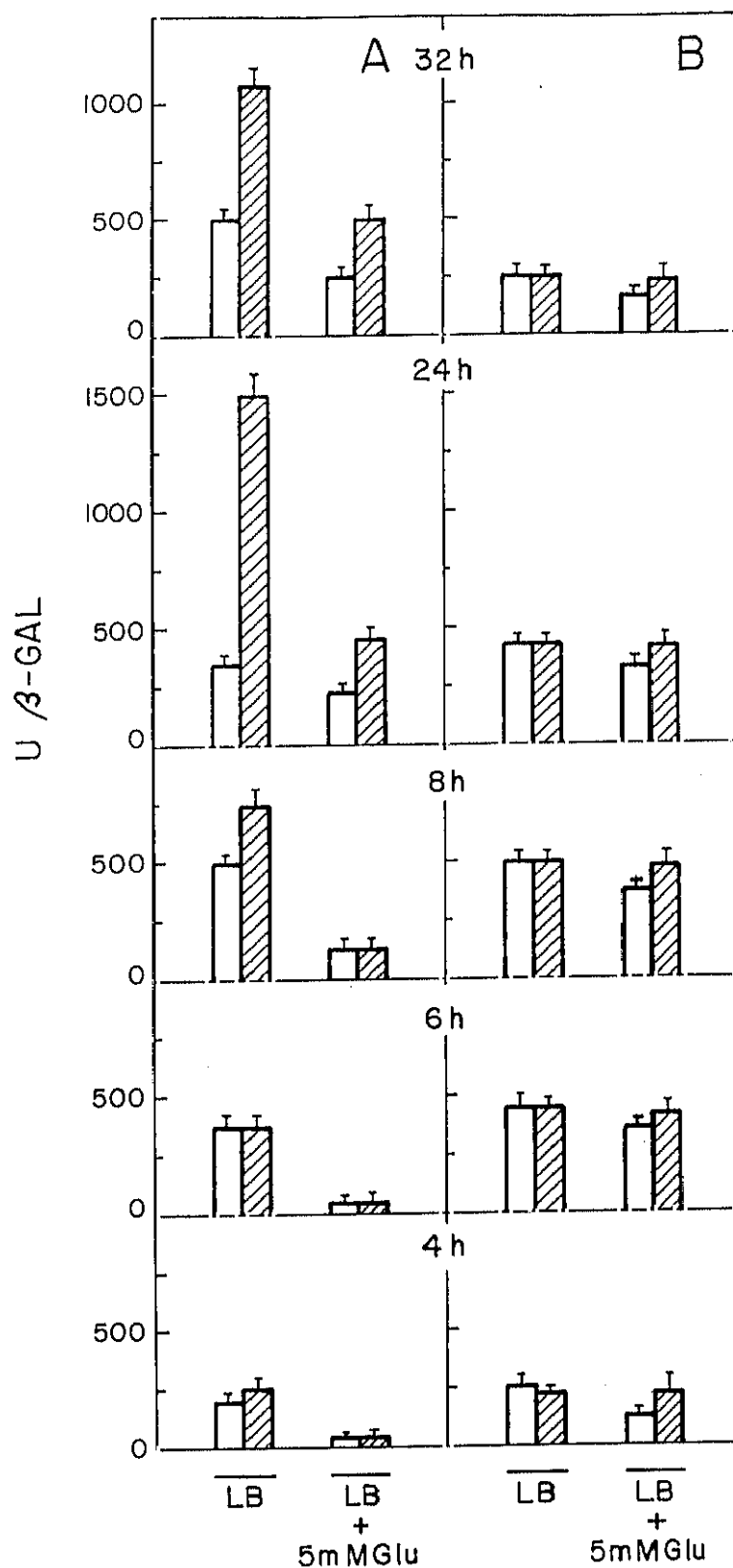


Figura 36. Producción de actividad β-galactosidasa. Expresión de la fusión génica pSKSE que porta el promotor del gen *pac* de *E. coli* unido al gen *lacZ*. **A.** Cepa MC4100 (*crp*⁺). **B.** Cepa SBS688 (*crp*⁻). En ambos casos se utiliza el medio LB en ausencia o presencia de glucosa 5 mM. Los cultivos se crecieron a 28 °C ensayando la actividad a los tiempos que se indican. U β-GAL, unidades de actividad β-galactosidasa (ver Materiales y Métodos). Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA.

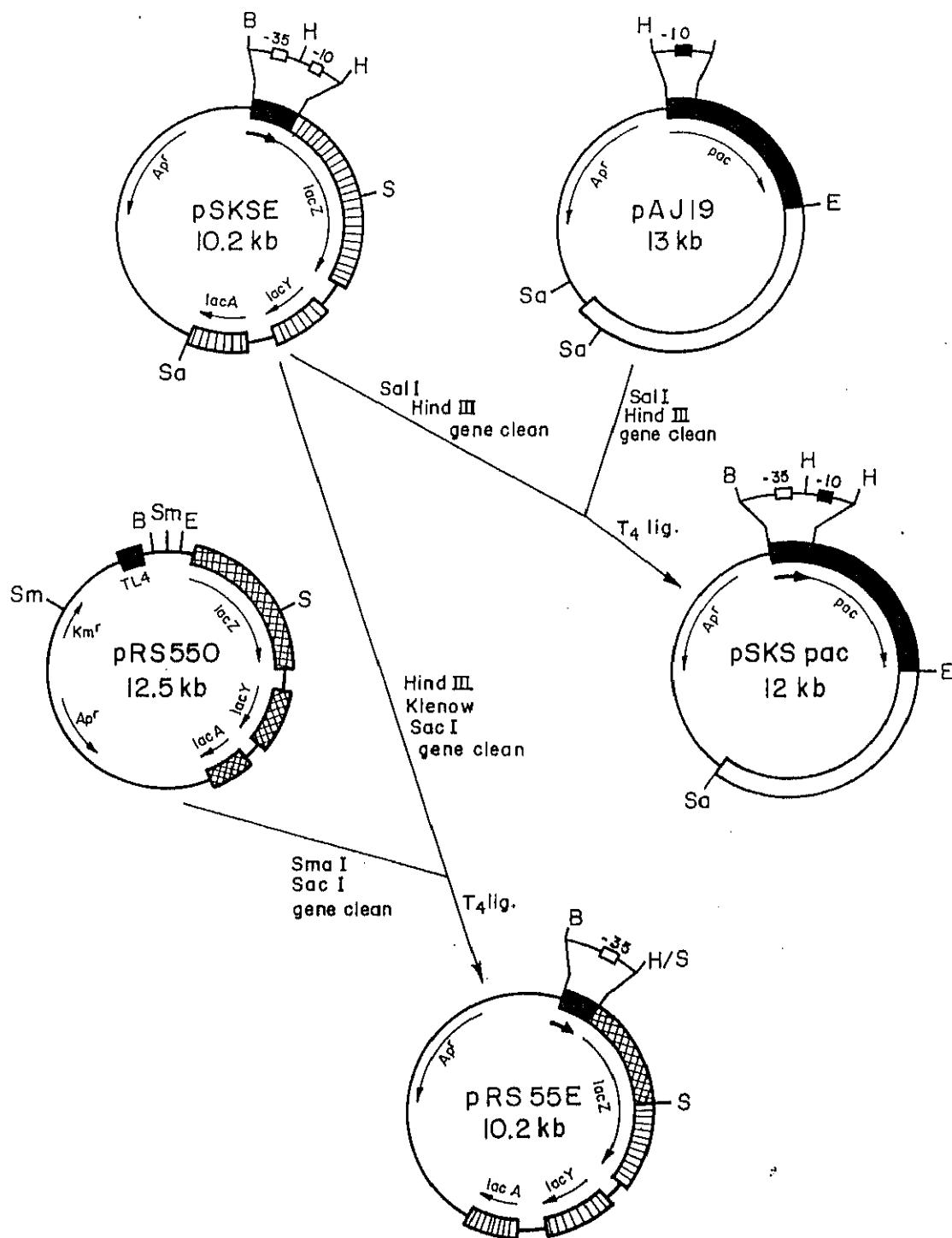


Figura 37. Diseño de las construcciones génicas pSKSpac y pRS55E. Las cajas rayadas o con trama representan el operon *lac* que codifica por la β -galactosidasa. Las cajas en negro representan el gen *pac* de *E. coli*. Se han señalado los sitios de restricción más significativos. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; Sm, *Sma*I. T₄ lig, DNA ligasa del fago T₄; Klenow, fragmento Klenow de la DNA polimerasa. Ap, ampicilina; Km, kanamicina. -10 y -35, secuencias -10 y -35 del promotor del gen *pac* de *K. citrophila*. CRP, sitio del unión del complejo CRP-cAMP; RBS, sitio de unión al ribosoma; ATG, codon de iniciación de la traducción.

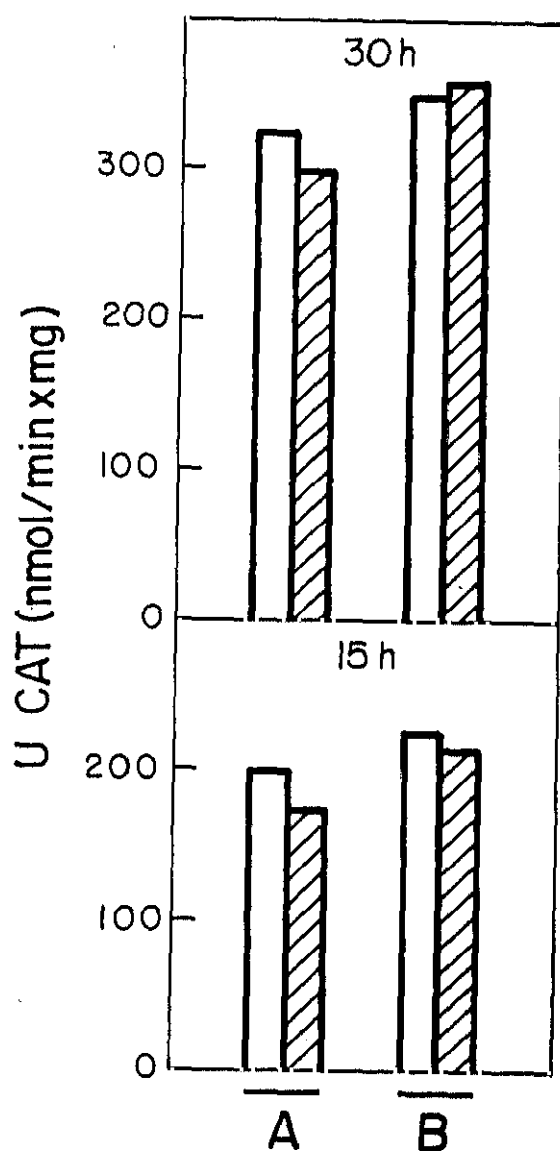


Figura 38. Producción de actividad cloranfenicol acetiltransferasa. Expresión de la fusión génica pSKSK. **A.** HB101(pSKSE) **B.** MC4100(pSKSE). U CAT, unidades de actividad cloranfenicol acetiltransferasa (ver Materiales y Métodos). Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA. Los cultivos se crecieron a 28 °C.

detectándose inducción por FA en ninguna de ellas, si bien la producción en la cepa MC4100 parece algo mayor (figura 38).

Dado que no se consiguió aislar ningún clon portador de la secuencia reguladora completa del gen *pac* de *E. coli* en el vector pKK232-8, una explicación podría buscarse en el método de selección. Este se basa en la capacidad de los clones de crecer en presencia de cloranfenicol. La fortaleza de los promotores se puede valorar semicuantitativamente, utilizando concentraciones crecientes de cloranfenicol desde 5 a 600 µg/ml. El promotor del gen *pac* no es fuerte, y por lo tanto, se realizó la selección sobre concentraciones de cloranfenicol de 35 µg/ml, o menores. Esta selección se llevó a cabo en presencia de FA, considerando el carácter inducible del promotor del gen *pac* de *E. coli*. Sin embargo, los clones que crecieron más rápidamente sobre placas con medio LB, en presencia de FA y cloranfenicol 35 µg/ml, no llevaban la fusión de CAT correcta. Estos clones llevaban fusiones de CAT al promotor con una delección del fragmento *HindIII*, que contiene la región -10 propuesta por Bolívar (figura 33). A esta fusión se la denominó pKKE21 (figura 34B). Cuando se analizaron los clones con un crecimiento más lento, sobre las placas ya descritas, se encontró que portaban fusiones de CAT al promotor con el fragmento *HindIII* invertido, respecto del promotor del gen *pac*, y por lo tanto la región -10 invertida. A esta fusión se la denominó pKKE18 (figura 34B).

En paralelo a los ensayos de las actividades β-galactosidasa y CAT, se realizaron los controles de la actividad β-lactamasa. Este control permite descartar la posibilidad de una variación en la producción como resultado de una variación del número de copias del plásmido. Las medidas realizadas mostraron una actividad β-lactamasa constante.

Las actividades basales de β-galactosidasa y CAT en las diferentes cepas de *E. coli* utilizadas en el estudio, transformadas con los vectores pSKS107 y pKK232-8 respectivamente, permitió discriminar entre la actividad promotora específica de las secuencias reguladoras clonadas y cualquier otra actividad inespecífica del vector. Como era de esperar la producción basal de ambos vectores fue prácticamente nula.

3.1.2. ESTUDIOS DE REPRESION CATABOLICA.

Se ha descrito que la producción de PGA por *E. coli* es inhibida por carbohidratos y polialcoholes como por ejemplo, glucosa, fructosa y glicerol (Kaufmann y Bauer, 1964; Szentirmai, 1964). La producción de la PGA de *K. citrophila* también presenta represión por catabolito (Okachi y col. 1972). Valle y col. (1986) han propuesto que en la zona reguladora del gen *pac* de *E. coli* hay dos posibles sitios de unión de CRP. En la secuencia reguladora del gen *pac* de *K. citrophila* se conservan estos dos motivos, lo que podría indicar un mecanismo similar de regulación (figura 33). Los estudios que se muestran a continuación tratan de esclarecer la naturaleza de la represión por catabolito así como de estudiar su dependencia respecto de otros factores.

3.1.2.1. Represión catabólica por glucosa.

Se ha estudiado el efecto del glicerol y de la glucosa sobre la producción de β -galactosidasa, utilizando las fusiones génicas pSKSE y pSKSK. En la tabla 18 se muestra el grado de inhibición alcanzado en la expresión de cada una de ellas. La represión catabólica por glucosa muestra un efecto muy similar para las regiones reguladoras del gen *pac* de *E. coli* y *K. citrophila*. El glicerol parece ejercer mayor inhibición sobre la región reguladora del gen *pac* de *E. coli*. Tanto la glucosa como el glicerol ejercieron inhibición en los cultivos sin inducir siendo más notable el efecto sobre la región reguladora del gen *pac* de *K. citrophila* (figuras 35A y 36A).

Considerando estos resultados se eligió una concentración de glucosa 5 mM como la más adecuada para realizar los estudios que se muestran a continuación, pues ejerce una inhibición manifiesta, pero permite realizar un seguimiento de actividad. En primer lugar, se evaluó la represión catabólica a diferentes tiempos de fermentación (figuras 35A y 36A). El máximo grado de inhibición se obtuvo a las 24 h, comenzando a disminuir este efecto con el envejecimiento de los cultivos. Aunque no se muestra, a las 48 h se había igualado la producción de β -galactosidasa en presencia o ausencia de glucosa 5 mM, debido a que en los cultivos sin glucosa disminuyó la producción de β -galactosidasa, mientras que en los cultivos con glucosa aumentó.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la represión por glucosa tiene lugar a nivel transcripcional. Asimismo se manifiesta el efecto inductor del FA en los clones con la región reguladora del gen *pac* de *E. coli*, incluso en presencia de glucosa o glicerol, lo que indica que la represión por glucosa y la inducción por FA pueden ejercer su efecto regulador simultáneamente.

3.1.2.2. Dependencia de CRP de la represión catabólica.

Con objeto de determinar si la represión catabólica está mediada por el complejo CRP-cAMP se transformó la cepa SBS688 [MC4100 ($\Delta crp39$)] con las construcciones pSKSE y pSKSK. Los mutantes *crp* son pleiotrópicamente defectivos en la expresión de enzimas catabólicas inducibles. Si la represión por catabolito es dependiente del complejo CRP-cAMP en esta cepa mutante debe observarse la misma actividad promotora tanto en ausencia como en presencia de glucosa.

Se comprobó el fenotipo de los transformantes sobre placas con medio MacConkey conteniendo maltosa al 0,5 %. Las cepas *crp*⁺ fueron capaces de fermentar el azúcar con la consiguiente acidificación del medio, originando colonias rojas. En el caso de la cepa *crp*⁻ al no poder fermentar el azúcar se originaron colonias de color blanco.

Tabla 18. Efecto de la concentración de glucosa y glicerol en la producción de las fusiones con β -galactosidasa. Se ha cuantificado el grado de inhibición en la producción de unidades β -galactosidasa bajo el control de las regiones reguladoras del gen *pac* de *E. coli* (pSKSE) y *K. citrophila* (pSKSK).

METABOLITO	% INHIBICION	
	MC4100 (pSKSE)	MC4100 (pSKSK)
Glucosa 1 mM	38	36
Glucosa 5 mM	61	65
Glucosa 10 mM	95	97
Glicerol 22 mM	25	50

Se crecieron cultivos de 15 ml en medio LB tamponado con tampón fosfato 0,1 M pH 7.5 y con FA 0,1 % a 30 °C durante 20 horas. Los porcentajes de inhibición se han calculado respecto a la actividad total que mostraron los cultivos utilizados como control, crecidos en las mismas condiciones pero sin metabolitos adicionales.

La presencia de glucosa 5 mM no ejerce represión catabólica sobre la producción de β -galactosidasa en ninguno de los casos (figuras 35B y 36B). Sin embargo, es notable la disminución en la producción que se obtiene con esta cepa respecto de la parental. Resulta interesante la ausencia de inducción por FA sobre el promotor de *E. coli*. Estos resultados indicarían, en primer lugar, que el fenómeno de represión catabólica está mediado por la unión al DNA del complejo CRP-cAMP y, por otro lado, que la ausencia de inducción por FA observada para el clon de *E. coli* podría estar indicando la existencia de una relación entre la unión del complejo CRP-cAMP y el proceso de la inducción causada por FA.

3.1.2.3. Efecto del cAMP. Influencia de la represión catabólica sobre la inducción por ácido fenilacético.

En el apartado anterior se ha comprobado la dependencia del fenómeno de represión catabólica de la unión de CRP-cAMP utilizando una cepa deficiente en la síntesis de CRP. Otra forma de comprobar esta dependencia se basa en la adición exógena de cAMP, ya que uno de los procesos responsables de la represión catabólica es la disminución de los niveles intracelulares de cAMP. El cAMP es capaz de contrarrestar la represión catabólica desencadenada en presencia de glucosa (Perlman y Pastan, 1968a), aunque también se han descrito casos donde el cAMP no media el efecto de la glucosa.

Los resultados obtenidos al analizar el efecto de la adición de cAMP 5 mM sobre cultivos de MC4100 transformada con pSKSE y pSKSK se muestran en las figuras 39 y 40, respectivamente. En un medio rico, o en el medio mínimo suplementado con casaminoácidos 10 mg/ml no se detectó ningún efecto, posiblemente por una inhibición del transporte del cAMP. El cAMP no afecta la producción de β -galactosidasa ni en presencia ni en ausencia de FA en los cultivos sin glucosa (figuras 39A y 40A). Sin embargo, el cAMP es capaz de contrarrestar la inhibición producida por la glucosa 5 mM (figuras 39B y 40B).

En condiciones de máxima represión catabólica se puede observar cómo el promotor del gen *pac* de *K. citrophila* se muestra inducible por FA (figura 39B), hecho que apunta de nuevo la posible conexión entre los sucesos de represión catabólica e inducción por FA observados en los apartados anteriores.

Con objeto de analizar la dependencia de CRP de la inducción por FA del promotor del gen *pac* de *K. citrophila*, se determinó la producción de β -galactosidasa en la cepa SBS688 en medio mínimo con glucosa 5 mM. Los resultados que se obtuvieron indican que en esta cepa no se produce inducción por FA, ni siquiera en condiciones de máxima represión catabólica (figura 39C). Tampoco se observó inducción por FA sobre el promotor del gen *pac* de *E. coli* en las mismas condiciones de cultivo (figura 40C).

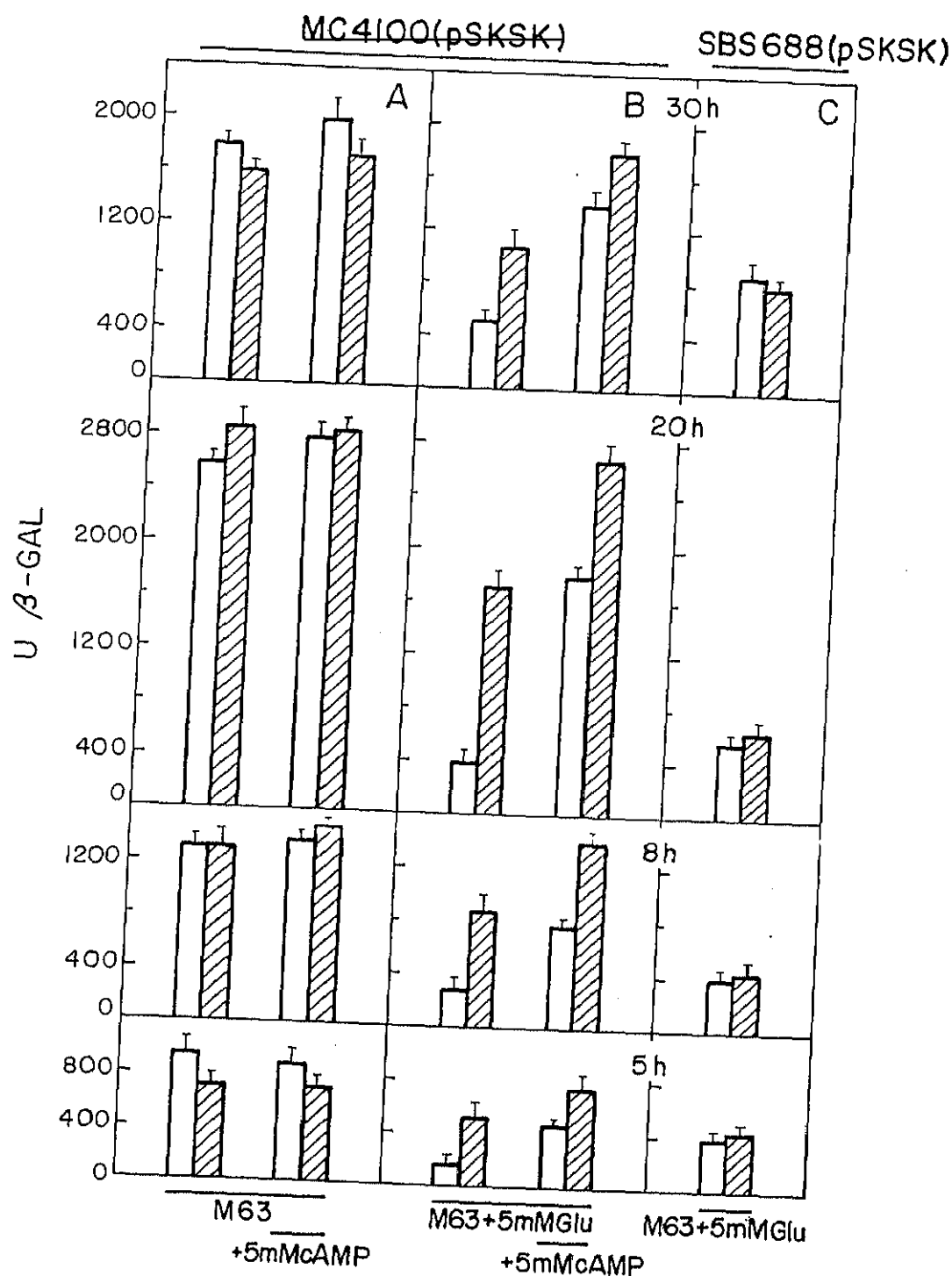


Figura 39. Producción de actividad β-galactosidasa. Expresión de la fusión génica pSKSK. A y B. MC4100(pSKSK). C. SBS688(pSKSK). Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA. Se indican los medios utilizados en cada caso. M63, medio mínimo M63, Glu, glucosa. Los cultivos se crecieron a 28 °C.

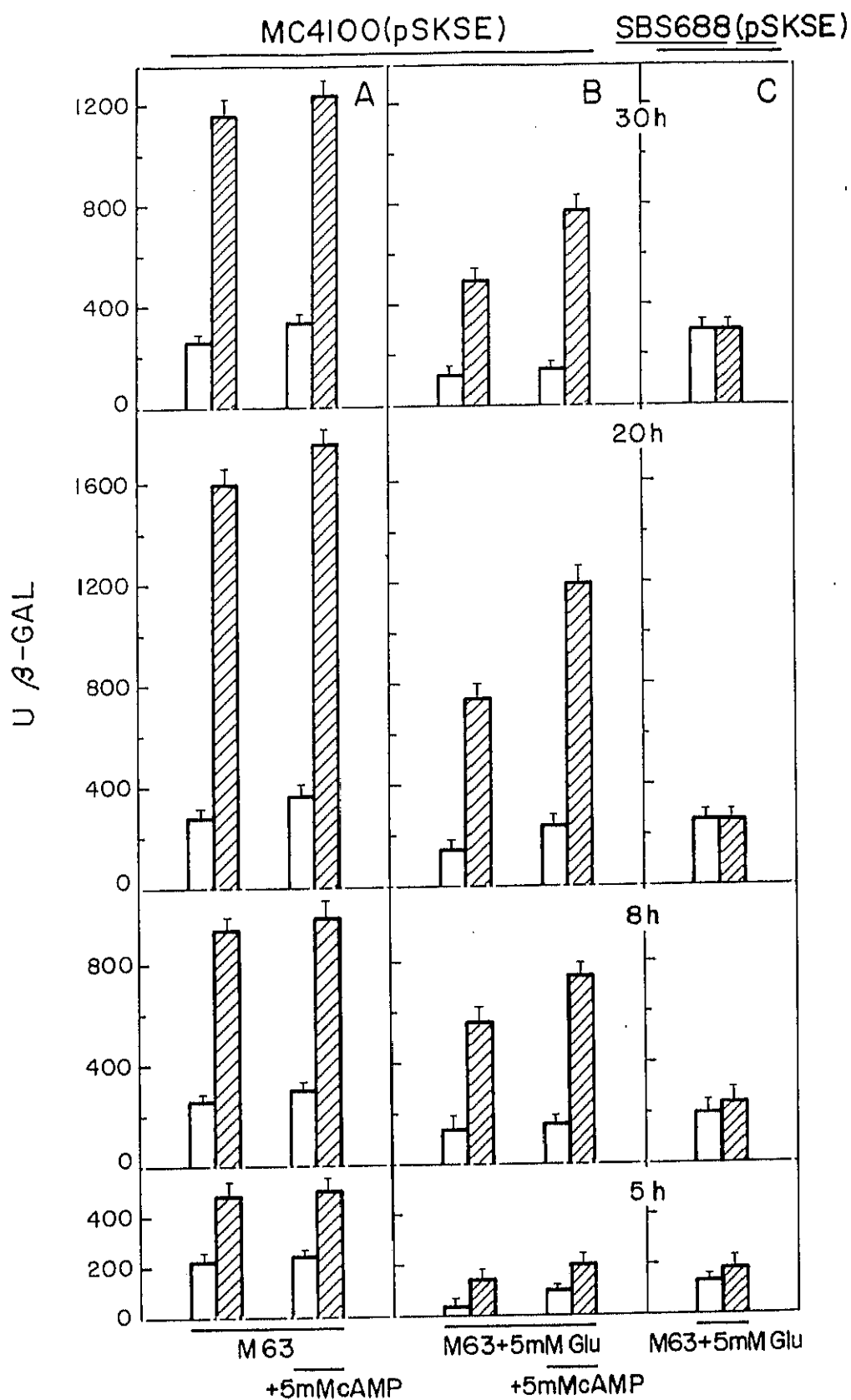


Figura 40. Producción de actividad β -galactosidasa. Expresión de la fusión génica pSKSE. A y B. MC4100(pSKSE). C. SBS688(pSKSE). Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA. Se indican los medios utilizados en cada caso. M63, medio mínimo M63, Glu, glucosa. Los cultivos se crecieron a 28 °C.

Este resultado podría deberse a una dependencia de CRP en el proceso de inducción por FA, pero quizás la explicación radique en la existencia de alguna mutación adicional de esta cepa que la incapacite a transportar el FA al interior celular. Tampoco se puede descartar la posibilidad de que hubiera alguna(s) proteína(s) mediadora(s) del efecto inductor del FA, que por estar alteradas en esta cepa no serían funcionales.

3.1.3. ANALISIS DE LA REGION -10 DEL PROMOTOR.

Se construyeron los plásmidos pKKE18 y pKKE21 que portan la región -10 del promotor propuesto por Valle y col. (1986) invertida o deleccionada, respectivamente, con objeto de estudiar la importancia de esta zona en la actividad promotora (figura 34B). Estos clones correspondían a fusiones con la proteína marcadora CAT. Asimismo se ha construido el plásmido pRS55E (figura 37) en donde la enzima marcador es la β -galactosidasa. Esta última construcción, a diferencia de las anteriores fusiones con β -galactosidasa, utiliza el codon de iniciación del gen *lac Z*.

Los clones HB101(pKKE18) y HB101(pKKE21) mostraron una producción constitutiva de la actividad CAT (figura 41). El clon HB101(pKKE18) mostró una producción mayor que el clon HB101(pKKE21), e incluso que el clon HB101(pKKK22), que contenía el plásmido portador del promotor del gen *pac* de *K. citrophila* (figura 38). Se obtuvo el mismo resultado al analizar los clones MC4100 (pKKE18) y MC4100(pKKE21), aunque mostraron un nivel de producción algo superior (figura 41).

El estudio del clon MC4100 (pRS55E) confirmó la falta de inducción por FA cuando se cultivó en medio rico (figura 42A). Asimismo, mostró represión catabólica por glucosa. Sin embargo, al estudiar la represión catabólica en medio mínimo M63 se observó inducción por FA (figura 42B).

3.1.4. DETERMINACION DEL SITIO DE INICIACION DE LA TRANSCRIPCION.

3.1.4.1. Identificación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *K. citrophila*.

Se ha procedido a identificar mediante "primer extension" (PEX) (extensión del cebador), el sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *K. citrophila* para poder determinar con exactitud las regiones responsables de su regulación (figura 43). En un primer estudio, se determinó el sitio de iniciación de la transcripción utilizando RNA aislado del clon MC4100(pSKSK). De este modo se identificó el sitio de iniciación de la transcripción en la posición -76 respecto del sitio de iniciación de la traducción (ATG inicial) (figura 47).

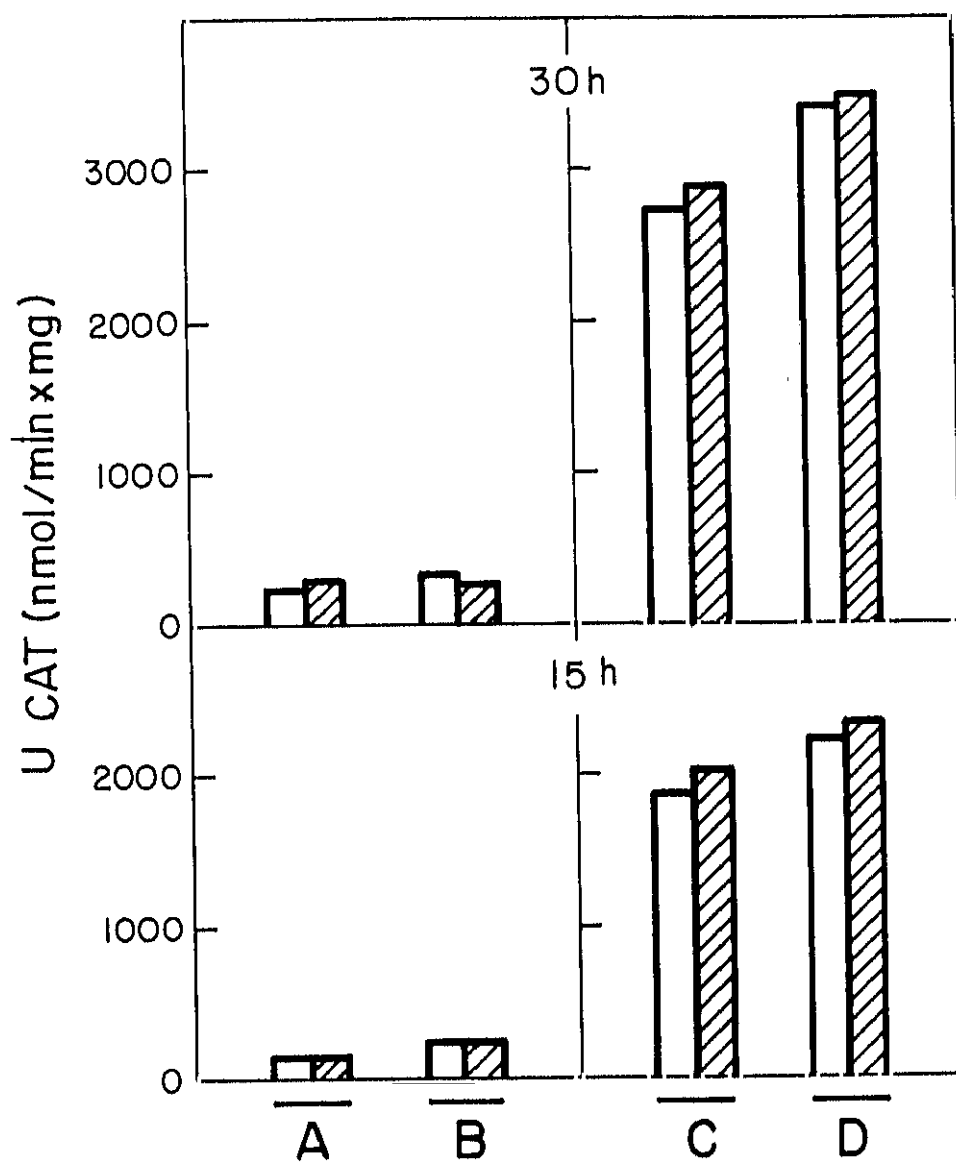


Figura 41. Producción de actividad cloranfenicol acetiltransferasa. A, HB101(pSKSE21). B, MC4100(pSKSE21). C, HB101(pSKSE18). D, Mc4100(pSKSE18). U CAT, unidades de actividad cloranfenicol acetiltransferasa (ver Materiales y Métodos). Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA. Los cultivos se crecieron a 28 °C.

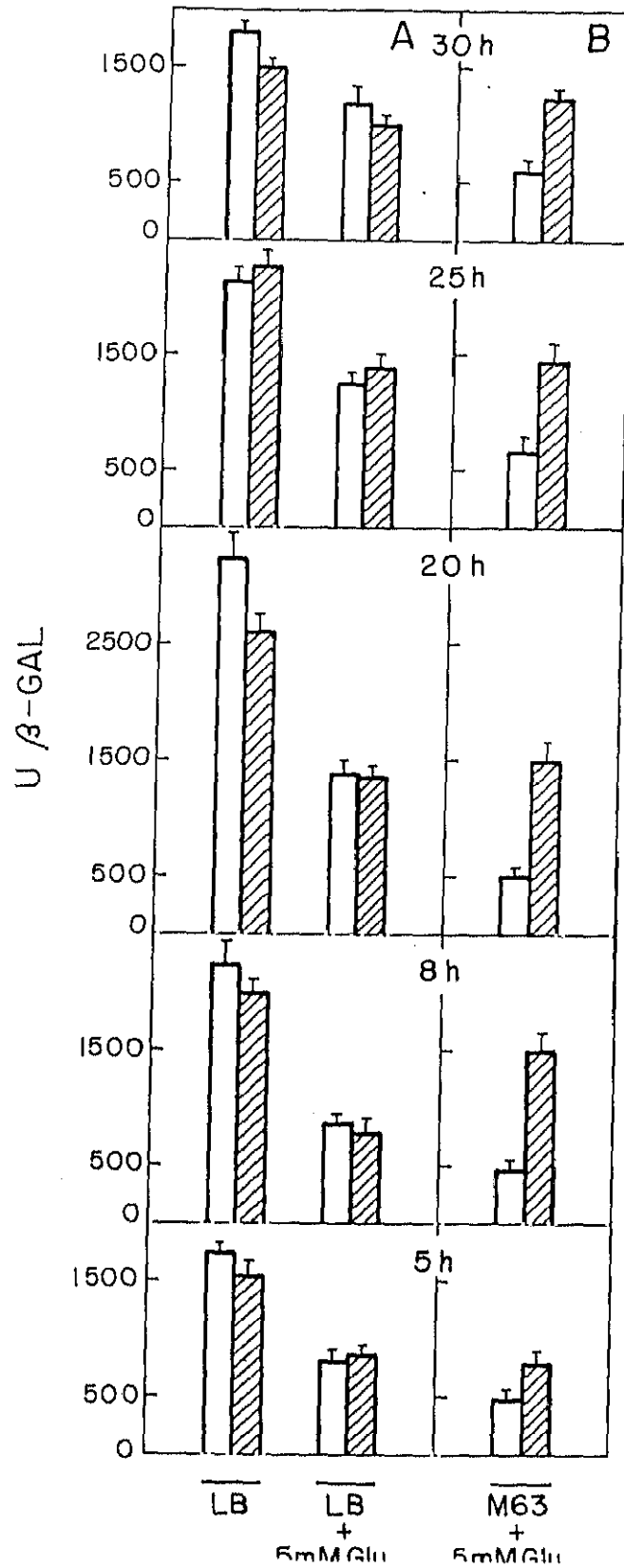


Figura 42. Producción de actividad β -galactosidasa. Expresión de la fusión génica pRS55E. Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA. Los cultivos se crecieron a 28 °C. A. En medio LB con o sin glucosa 5 mM. B. En medio mínimo M63 en presencia de glucosa 5 mM.

Qiaoling y col. (1992a y b) han propuesto que la secuencia del gen *pac* de *E. coli* contiene una región que interviene en la regulación de su expresión a nivel transcripcional. Con objeto de determinar si en la expresión del gen *pac* de *K. citrophila* se produce una regulación similar, se aisló el RNA de la cepa de *E. coli* HB101 portadora del plásmido pYKH5 que lleva el gen *pac* de *K. citrophila* bajo el control de su promotor. El resultado obtenido indica que la iniciación de la transcripción se produce en el mismo sitio (figura 43).

3.1.4.2. Identificación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli*.

Según los datos presentados anteriormente, el sitio de iniciación de la transcripción identificado para el gen *pac* de *K. citrophila* no coincide con el sitio de iniciación de la transcripción identificado por Valle y col. (1986) para el gen *pac* de *E. coli*. Estos habían localizado el sitio de iniciación de la transcripción en la posición -30 respecto del sitio de iniciación de la traducción. Debido a la similitud que presentan las regiones reguladoras del gen *pac* de *E. coli* y *K. citrophila*, era probable encontrar un mismo sitio de iniciación en ambos casos. Dado que Oh y col. (1987) propusieron un promotor diferente para el mismo gen, se procedió a identificar el sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli*.

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis por PEX del RNA aislado del clon MC4100 (pSKSE) (figura 44). El experimento se realizó en paralelo con el clon MC4100 (pSKSK) (figura 44). El resultado obtenido al analizar el RNA del cultivo de MC4100 (pSKSE) en fase exponencial de crecimiento, muestra un sitio de iniciación de la transcripción en la posición -77 desde el ATG. Este resultado coincide con el obtenido al realizar el PEX con el RNA de la cepa MC4100 (pSKSK) (figura 44E₂ y figura 43). Cuando se analizó el RNA aislado del cultivo en fase estacionaria, se observó una banda mayoritaria de iniciación de la transcripción coincidente con las anteriores (figura 44E₁) y una ligera banda que sugiere un segundo sitio minoritario de iniciación de la transcripción en la posición -30 respecto del ATG inicial, coincidente con el sitio propuesto por Valle y col. (1986). Estos resultados podrían interpretarse considerando la posibilidad de que el gen *pac* de *E. coli* se transcribiera mediante dos promotores de diferente fortaleza quizás dependientes de las condiciones del medio, o bien que la banda de iniciación localizada a -30 correspondiera a un producto de degradación de la banda mayoritaria localizada a -77, pues se observa al analizar RNA de un cultivo más envejecido. En este sentido es importante tener en cuenta que Valle y col. (1986) determinaron el promotor del gen *pac* utilizando RNA de un cultivo en fase estacionaria.



Figura 43. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *K. citrophila*. E1, el RNA se extrajo de un cultivo de 6 horas a 28 °C del clon HB101(pYKH5). E2, el RNA se extrajo de un cultivo de 3 horas a 28 °C del clon HB101(pSKSK). El medio de cultivo fue LB en presencia de 0,1 % FA. Se utilizó el método A de PEX (ver Materiales y Métodos).

Con objeto de estudiar la influencia que pudieran presentar las condiciones de cultivo sobre el punto de iniciación de la transcripción, se realizaron PEX con RNA aislado de cultivos de MC4100 (pSKSE) y MC4100 (pSKSK) cultivados en medio mínimo con glucosa, a diferentes tiempos. En los estudios realizados en el apartado 3.2.3. se había observado la influencia de la represión catabólica sobre la inducción por FA y se pretendía estudiar si este suceso tenía repercusión sobre el punto de iniciación de la transcripción. En todos los casos se observa un único punto de iniciación de la transcripción, localizado en la posición -77 respecto del ATG inicial para el promotor de *E. coli* y en -76 para el promotor de *K. citrophila* (figura 45).

Por lo tanto, se podría concluir que el sitio de iniciación de la transcripción es independiente del efecto de la glucosa y de la inducción por FA.

Aunque el gen *pac* de *K. citrophila* no mostró influencia sobre el sitio de iniciación de la transcripción, se analizó la posibilidad de que la presencia del gen *pac* de *E. coli* pudiera tener algún efecto. Asimismo se determinó la posible interferencia de elementos reguladores específicos de la cepa originariamente productora de actividad PGA. Para ello se aisló RNA de dos cepas de *E. coli* diferentes, en primer lugar se aisló RNA de la cepa HB101(pPGA1), cepa productora de actividad PGA por transformación, y en segundo lugar se obtuvo el RNA de la cepa *E. coli* ATCC11105 productora de forma natural de actividad PGA, aunque también estaba transformada con pPGA1. Se muestra en la figura 46 cómo para ambos casos se observan dos puntos de iniciación de la transcripción que coinciden con los observados en la figura 44E₁, aunque ahora se invierte la intensidad de las bandas del transcrito. Bajo estas circunstancias aparece como más intensa la situada en la posición -30 respecto del ATG, sobre todo en el caso de la cepa *E. coli* ATCC11105 (figura 46E₁).

Estos resultados podrían indicar que la presencia del gen *pac* de *E. coli*, o la existencia de algún elemento regulador presente en las cepas de *E. coli* HB101 y ATCC11105, influye sobre el sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli*, a diferencia de lo que ocurría al estudiar el promotor del gen *pac* de *K. citrophila* (figura 43).

Podría concluirse que la región reguladora del gen *pac* de *K. citrophila* presenta un único sitio de iniciación de la transcripción localizado en la posición -76 respecto del punto de iniciación de la traducción. La región homóloga en *E. coli* es algo más compleja y presenta dos posibles sitios de iniciación de la transcripción localizados en -30 y en -77 respecto del ATG inicial. Estos sitios serían utilizados alternativamente dependiendo de la presencia de otros elementos de regulación adicionales.

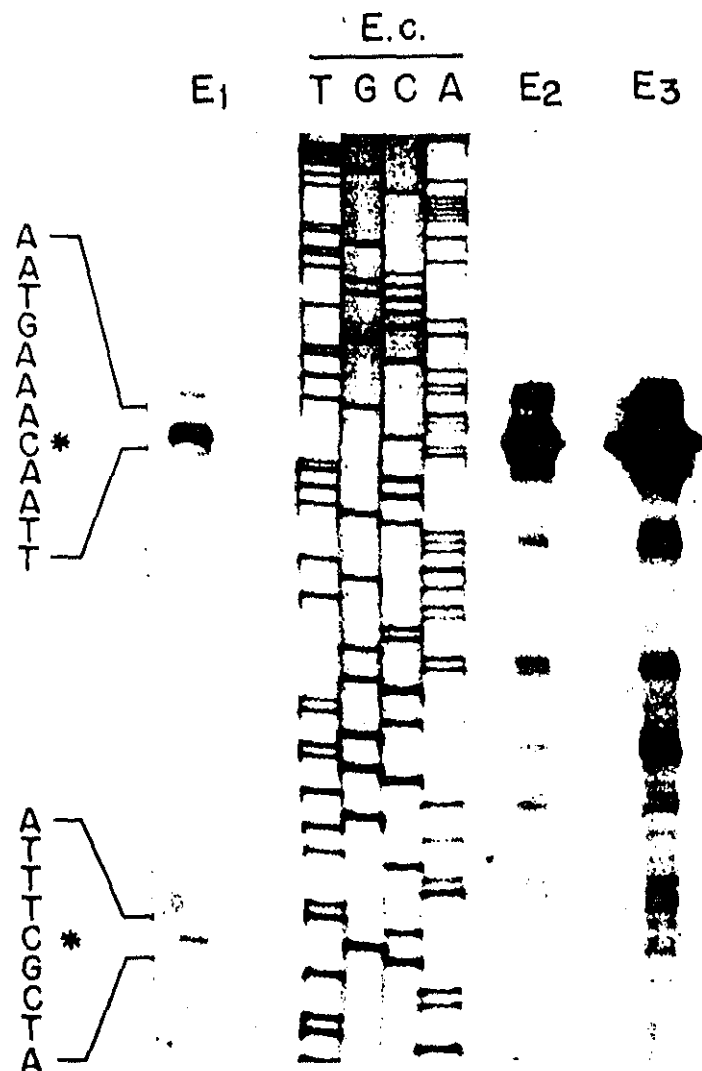


Figura 44. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli*. E1, el RNA se extrajo de un cultivo de 20 horas a 28 °C del clon MC4100(pSKSE). E2, el RNA se extrajo de un cultivo de 3 horas a 28 °C del clon MC4100(pSKSK). E3, el RNA se extrajo de un cultivo de 3 horas a 28 °C del clon MC4100(pSKSE). El medio de cultivo fue LB en presencia de 0,1 % FA. Se utilizó el método A de PEX (ver Materiales y Métodos).

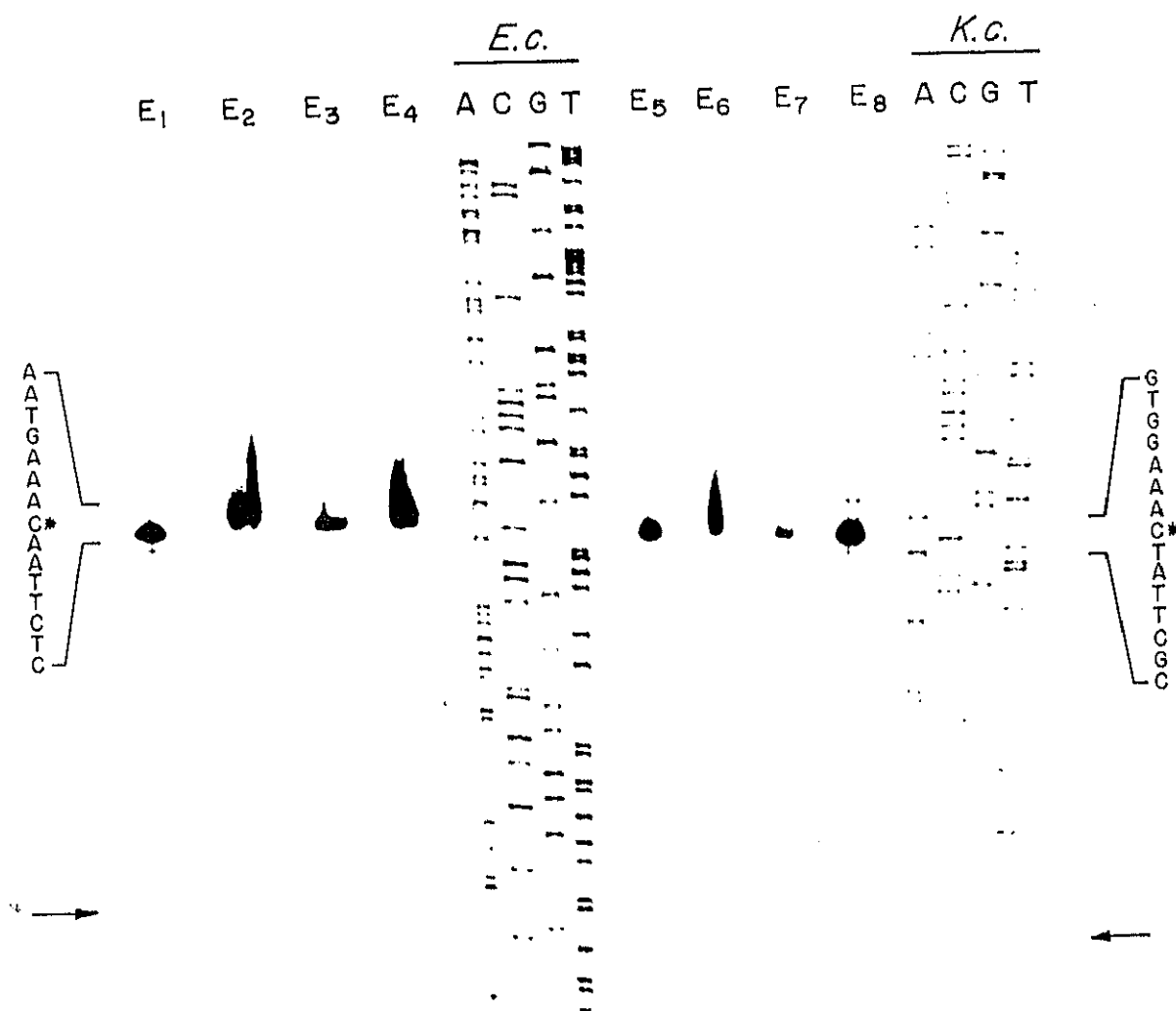


Figura 45. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli* y de *K. citrophila*. El RNA se extrajo de los cultivos crecidos a 28 °C y en medio mínimo M63 con glucosa 5 mM. E1, E3, E5 y E7, en presencia de 0,1 % FA. E2, E4, E6 y E8, sin FA en el medio de cultivo. E1 y E2, el RNA procede de un cultivo de 14 horas de MC4100(pSKSE). E3 y E4, el RNA procede de un cultivo de 3 horas de MC4100(pSKSE). E5 y E6, el RNA procede de un cultivo de 14 horas de MC4100(pSKSK). E7 y E8, el RNA procede de un cultivo de 3 horas de MC4100(pSKSK).

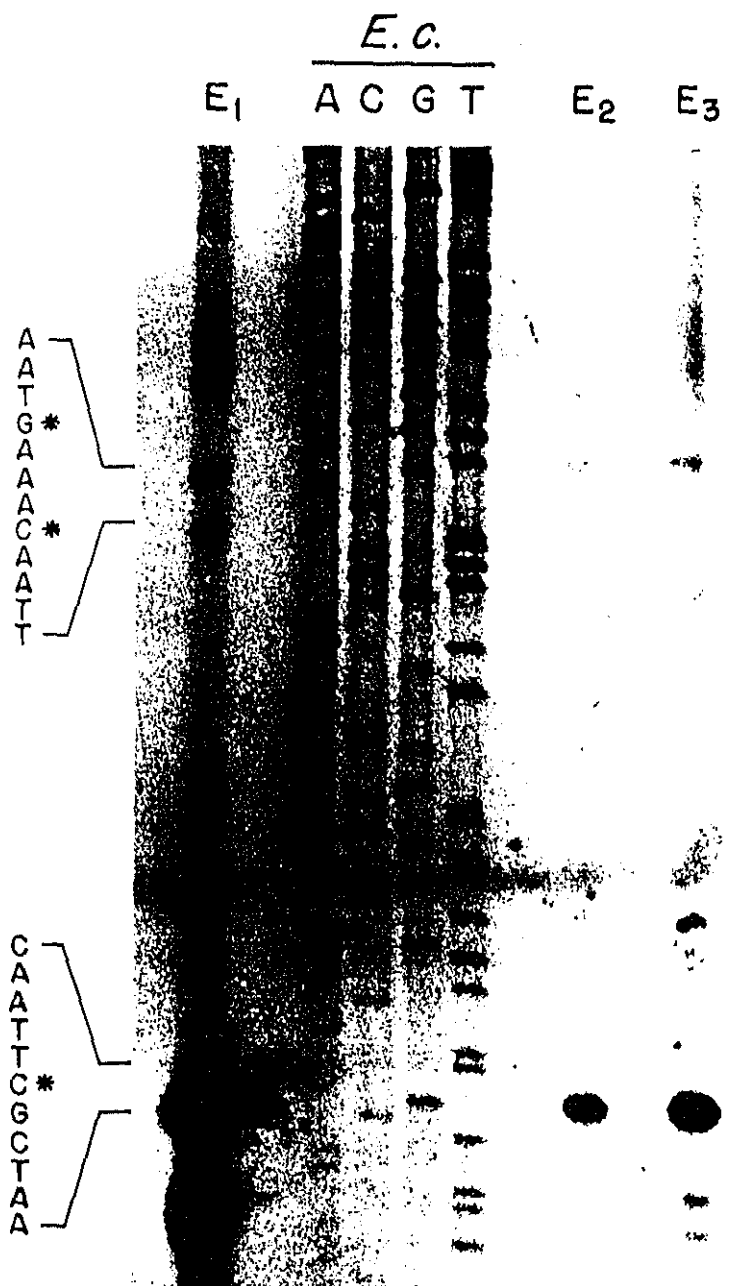


Figura 46. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli*.
 E1, el RNA se extrajo de un cultivo de *E. coli* ATCC 11105 (pPAG1) crecido 6 horas a 28 °C en medio LB en presencia de 0,1 % FA. E2, el RNA se extrajo de un cultivo de HB101(pPAG1) crecido 6 horas a 28 °C en medio LB en presencia de 0,1 % FA. E3, el RNA se extrajo de un cultivo de HB101(pPAG1) crecido 15 horas a 28 °C en medio LB en presencia de 0,1 % FA.

3.1.5. LOCALIZACION Y ANALISIS DEL PROMOTOR.

Una vez determinado el punto de iniciación de la transcripción se puede analizar la posible localización del promotor.

3.1.5.1. Promotor del gen *pac* de *K. citrophila*.

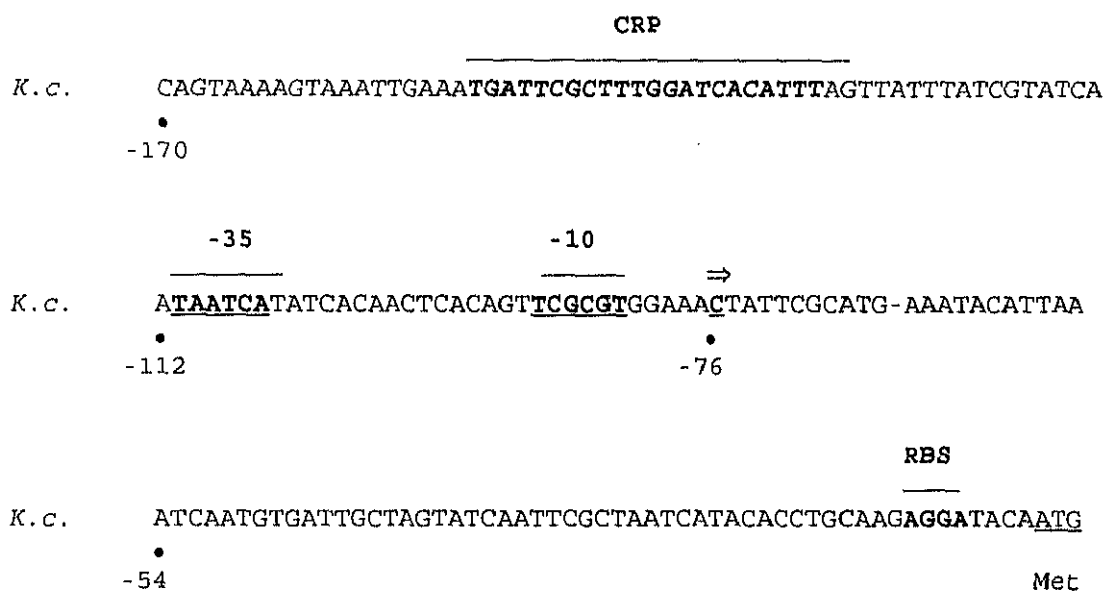
El análisis de la secuencia que precede al sitio de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *K. citrophila* revela dos posibles secuencias -35 y -10. En la figura 47 se señalan las regiones -35 (TAATCA) y -10 (TCGCGT) más probables, pues aunque coinciden con la secuencia consenso sólo en dos posiciones cada una, éstas se postula que son las posiciones más importantes en transcripción. Además se localizan a una distancia óptima para la actividad promotora. Una segunda posibilidad, sería considerar las regiones -35 (GTATCA) y -10 (CACAGT), ya que ambas presentan tres identidades con la secuencia consenso. Sin embargo, su localización podría resultar menos óptima. Asimismo, aparece un sitio potencial de unión de CRP (figura 47).

Se puede identificar otro elemento de reconocimiento de la RNA polimerasa, consistente en una secuencia rica en (A+T), localizada por delante de la región -35. Este tipo de secuencia se denomina elemento UP ("upstream promoter") o "enhancer", y se ha encontrado formando parte de muchos promotores procariotas. Esta clase de elementos reguladores se ha comprobado que estimula la transcripción (Ross y col., 1993).

3.1.5.2. Promotor del gen *pac* de *E. coli*.

Cuando se analiza la secuencia de nucleótidos anterior a cada uno de los dos sitios de iniciación de la transcripción, determinados en el apartado anterior, se observa la secuencia de un posible promotor para cada uno de ellos. Estas secuencias promotoras se indican a continuación:

A) Considerando como sitio de iniciación de la transcripción la posición -30 respecto al ATG inicial, se puede definir una posible región -10 (TAGTAT) y una posible región -35 (TAGATA) que presentan cuatro identidades con las secuencias consenso cada una, y que están separadas por 16 pares de bases (figura 48). Este promotor coincidiría con el previamente propuesto por Valle y col. (1986), aunque se han identificado algunas diferencias de secuencia en varios puntos de la región reguladora. Además del promotor propiamente dicho se han localizado dos sitios posibles de unión de CRP denominados CRP1 y CRP2 (figura 48).



En este promotor, también pueden encontrarse secuencias ricas en (A+T), o elementos UP. En la figura 48 se puede observar una región de estas características situada entre los posibles sitios de unión de CRP, CRP1 y CRP2, aunque la región entre CRP2 y la región -35 también es rica en (A+T).

B) Si se tiene en cuenta el sitio de iniciación de la transcripción localizado en la posición -76 respecto del ATG inicial, se puede identificar una posible región -10 (CATAAT) que lleva cinco identidades con la secuencia consenso, y una posible región -35 (TTAGTT) que sólo presenta dos identidades con la secuencia -35 consenso. La distancia que las separa es de 15 pares de bases y por tanto óptima (figura 49). En este caso de los dos posibles sitios de unión de CRP indicados en el apartado A) (figura 48), sólo uno sería funcional (figura 49). El principal elemento UP coincidiría con la secuencia señalada en el apartado anterior, pero se localizaría entre el sitio CRP y la región -35, como en el promotor del gen *pac* de *K. citrophila*.

3.1.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TRANSCRIPCION.

Otro de los aspectos interesantes dentro de la compleja regulación de la producción de actividad PGA por *E. coli* resulta de su estricta dependencia de la temperatura de crecimiento. La síntesis de PGA es óptima en un intervalo de 24 a 30 °C, no produciéndose enzima a 37 °C (Szentirmai, 1964). Este fenómeno se ha observado tanto en la cepa productora *E. coli* ATCC11105, como en otras cepas de *E. coli* conteniendo el gen *pac* clonado. A diferencia de lo que ocurre con la actividad PGA de *E. coli*, la producción en *K. citrophila* no es dependiente de la temperatura, consiguiéndose actividad PGA cuando se cultiva a 37 °C. Este comportamiento se observa con la cepa productora, *K. citrophila* ATCC21285 y con *E. coli* portando el gen *pac* de *K. citrophila* (García y Buesa, 1986). El origen de este hecho no había sido caracterizado a nivel molecular. No parecía ser un problema de inestabilidad de la enzima, y por tanto debía buscarse una explicación a nivel de transcripción, de traducción o de procesamiento postraduccional de la PGA.

Se estudió el efecto de la temperatura a nivel de transcripción, utilizando las fusiones a β -galactosidasa diseñadas para caracterizar la región reguladora del gen *pac*. Con objeto de comparar el proceso de regulación en *E. coli* y *K. citrophila* se crecieron en paralelo cultivos de MC1116 (pSKSE) y de MC4100 (pSKSK) respectivamente, a varias temperaturas (30, 37 y 40 °C) y a diferentes tiempos, analizando la producción de β -galactosidasa. Los resultados indican que la transcripción se produce indistintamente a 30 ó 37 °C para los cultivos de MC1116 (pSKSE). También hay transcripción a 40 °C, aunque menos eficiente. A las tres temperaturas se observa inducción por FA (figura 50). En los cultivos de MC1116 (pSKSK) también hay transcripción a 30, 37 y 40 °C, mostrando ausencia de inducción por FA en cualquiera de los casos (figura 51).

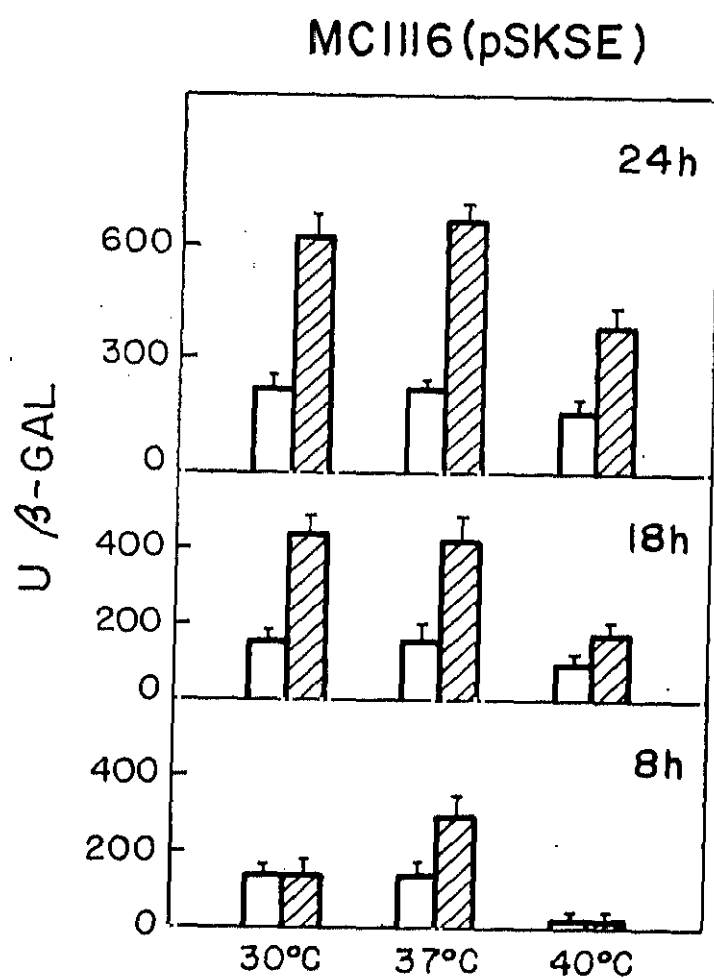


Figura 50. Producción de actividad β -galactosidasa. Expresión de la fusión génica pSKSE. Los cultivos se crecieron en medio LB a las temperaturas indicadas. Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA

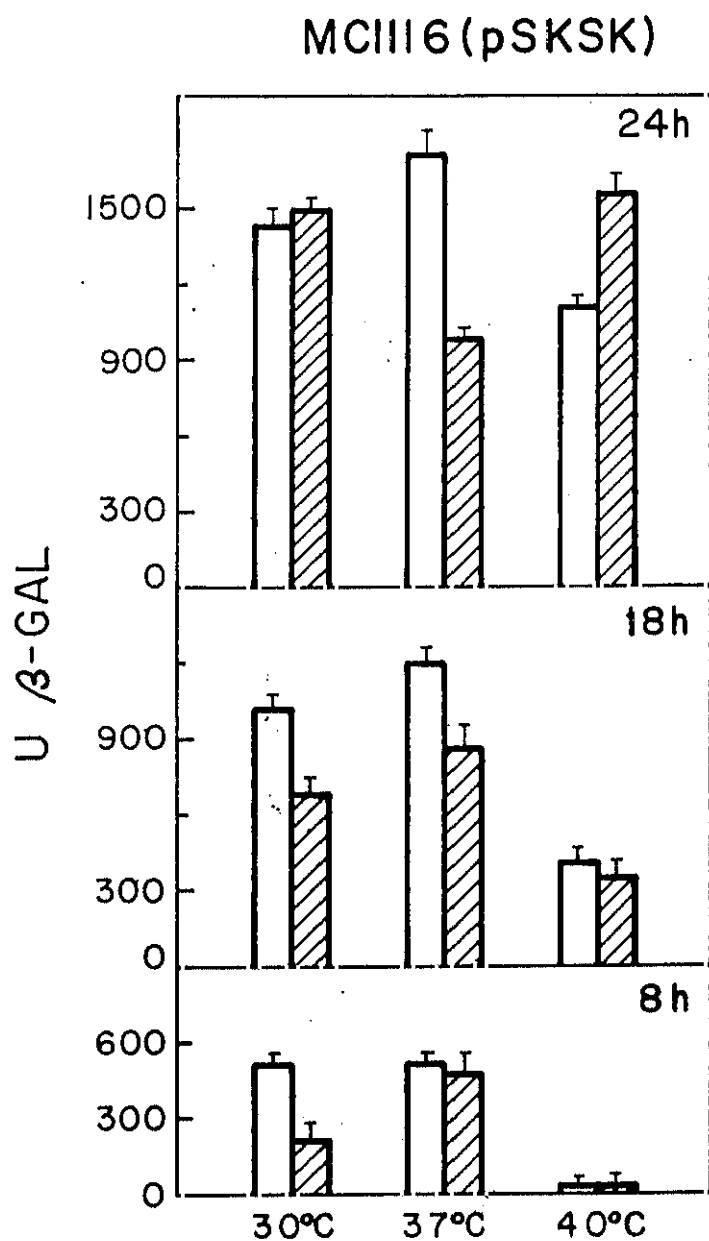


Figura 51. Producción de actividad β-galactosidasa. Expresión de la fusión génica pSKSK. Los cultivos se crecieron en medio LB a las temperaturas indicadas. Las cajas rayadas indican que el medio de cultivo lleva un 0,1 % de FA. Las cajas en blanco no llevan FA

A la vista de estos resultados se puede concluir que la estricta dependencia de temperatura observada para la producción de PGA de *E. coli* no parece ligada a un fenómeno de transcripción.

3.2 REGULACION POSTRADUCCIONAL.

3.2.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL PROCESAMIENTO POSTRADUCCIONAL.

Para estudiar la influencia que ejerce la temperatura en el procesamiento postraducciona de la PGA de *K. citrophila* se obtuvieron anticuerpos policlonales frente a la PGA de *K. citrophila*. Esto ha permitido un seguimiento del procesamiento enzimático mediante la técnica del "western blot".

En primer lugar, se ha realizado una curva de crecimiento del clon HB101(pYKD59) a 30 y 37 °C donde queda patente la producción diferencial de actividad PGA entre ambas temperaturas (figura 52). A 37 °C sólo se consigue un 60 % de la producción que se obtiene a 30 °C. También hay diferencias en cuanto al tiempo de fermentación que rinde la producción máxima, que corresponde a 30 horas a 30 °C y a 10 horas a 37 °C.

Se tomaron muestras de cultivo a diferentes tiempos y se estudiaron mediante "western blot". El resultado muestra la coexistencia del precursor de 94 kD con la proteína procesada en sus subunidades estructurales α y β , de 23 y 62 kD respectivamente, durante casi todo el proceso de fermentación a 37 °C (figura 53B). Sin embargo, en las muestras tomadas de la fermentación a 30 °C se aprecia la banda correspondiente al precursor enzimático con menos intensidad salvo en el tiempo de mayor producción, aunque sí se observan las subunidades estructurales de la PGA (figura 53A). Este resultado parece indicar que el procesamiento postraducciona es más eficaz a 30 °C y por ello se consiguen aumentar los niveles de producción a esta temperatura.

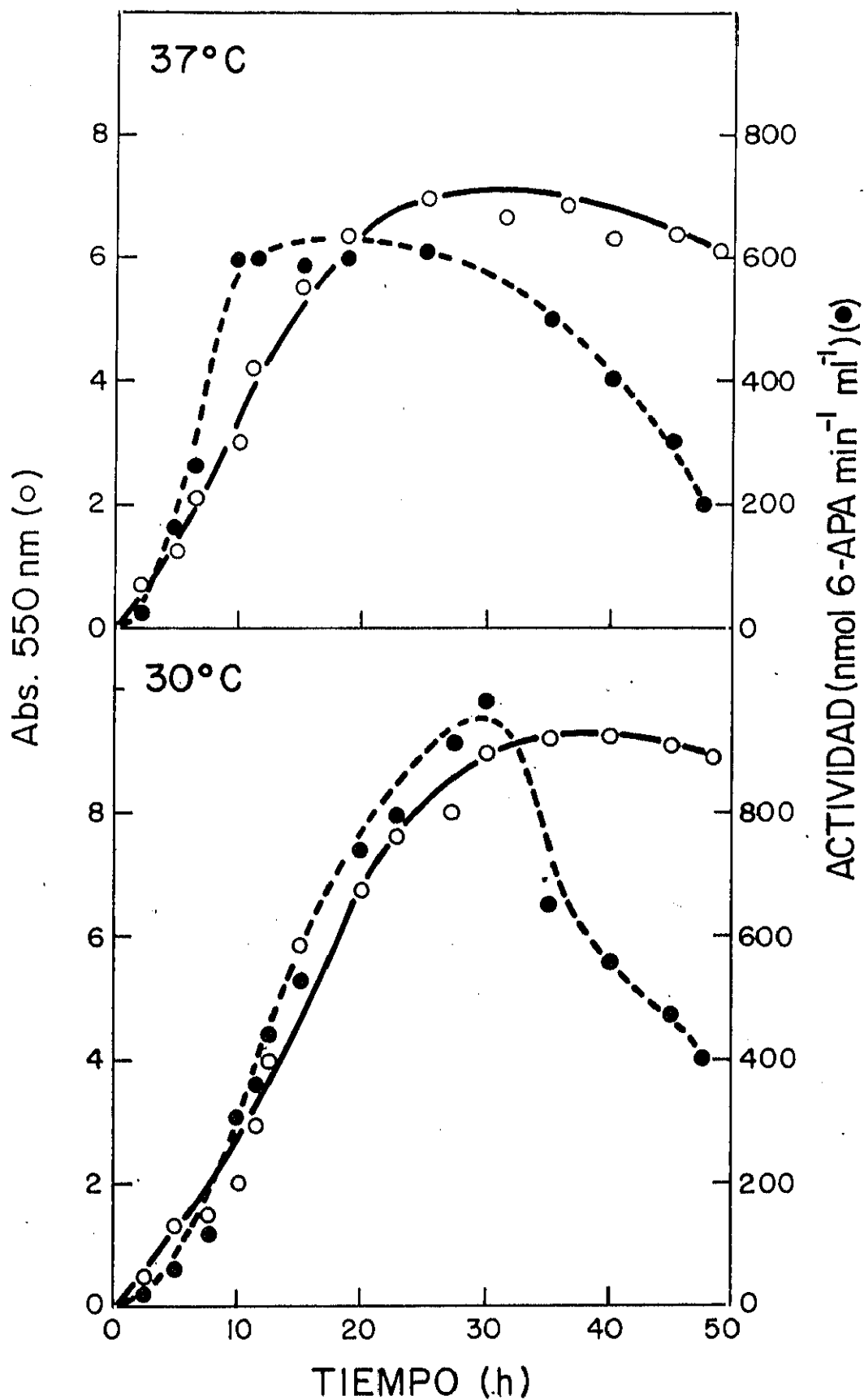


Figura 52. Curva de crecimiento a 30 °C y 37 ° de HB101(pYKD59). Los círculos en blanco corresponden al valor de absorbancia del cultivo a 550 nm. Los círculos en negro corresponden a la actividad utilizando penicilina G como sustrato.

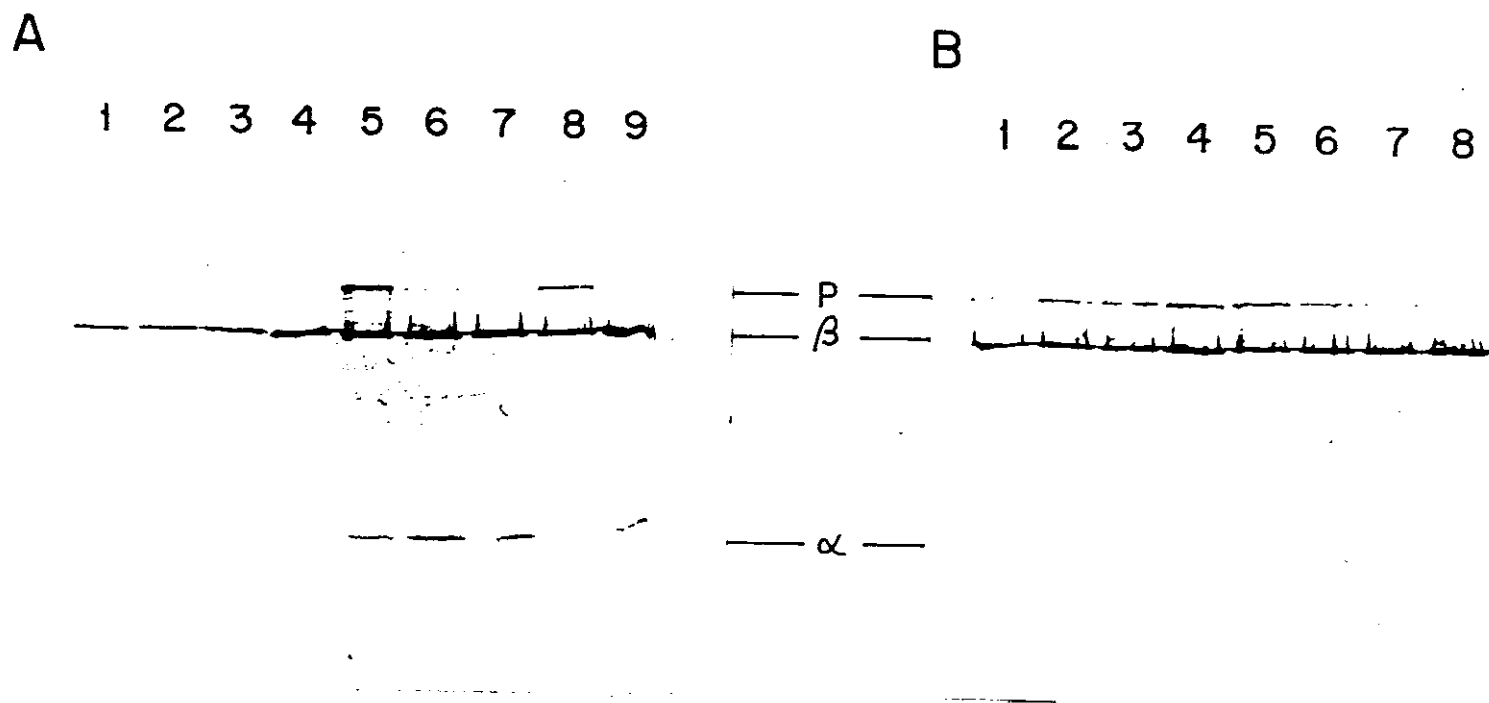


Figura 53. Procesamiento del precursor de la PGA de *K. citrophila*. α , subunidad α de la PGA; β , subunidad β de la PGA y P, precursor sin procesar. **A**, muestras correspondientes a cultivos crecidos a 30 °C. **B**, a 37 °C. Las calles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, corresponden a los siguientes tiempos de cultivo: 4, 7, 10, 20, 30, 35, 40 y 45 horas.

DISCUSSION

1. LA PGA COMO MIEMBRO DE UNA FAMILIA DE SERIN-ENZIMAS. DISEÑO DE MUTANTES

Las enzimas han desarrollado a lo largo de la evolución, estructuras precisas que las capacitan para catalizar reacciones químicas con una gran eficiencia. Uno de los principales objetivos de la ingeniería de proteínas, consiste en la creación de proteínas con nuevas propiedades catalíticas, que proporcionen mayores niveles de actividad, y que muestren nueva especificidad de sustrato. Una aproximación a este objetivo consiste en el empleo de la mutagénesis, para cambiar la especificidad de sustrato de una enzima.

Las bases moleculares de la unión de sustrato, y de la catálisis, mediada por la PGA de *K. citrophila*, no han sido determinadas, constituyendo su estudio, parte de los objetivos propuestos. En ausencia de datos sobre su estructura tridimensional, se han tenido en cuenta otras evidencias estructurales o de función. Partiendo de enzimas que presentan características comunes, en lo que a especificidad de sustrato o mecanismo catalítico se refiere, se comparan para vislumbrar residuos o regiones conservadas lo que determina las potenciales secuencias de interés para su estudio. Este abordaje ha sido extensamente utilizado en los últimos años.

La primera aproximación, consiste en buscar enzimas que reconozcan los mismos sustratos. Las enzimas que reconocen penicilina pueden clasificarse en cuatro grandes grupos atendiendo a sus propiedades catalíticas:

- Las enzimas del metabolismo secundario de microorganismos productores de penicilinas.
- Las DD-peptidasas o PBPs, implicadas en la biosíntesis de la pared bacteriana.
- Las β -lactamasas, que confieren resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos.
- Las β -lactam acilasas (BLA), que son objeto de estudio en esta memoria.

Las enzimas responsables de la biosíntesis de penicilinas, aún habiéndose caracterizado funcionalmente e incluso aislado en su mayoría, no son todavía conocidas estructuralmente (Aharonowith y Cohen, 1992). Las DD-peptidasas, o PBPs, son enzimas que se inactivan por antibióticos β -lactámicos, cuyo enlace amida endocíclico es equivalente al enlace peptídico de los peptidoglicanos (Frère y Joris, 1985). Las β -lactamasas hidrolizan los antibióticos β -lactámicos a metabolitos biológicamente inactivos (Abraham y chain, 1940). Estos dos últimos grupos de enzimas no sólo se unen a ligandos similares, sino que también presentan un mecanismo catalítico común, caracterizado por la presencia de un intermedio covalente acil-enzima. Mediante este mecanismo, el resto acilo del anillo β -lactámico es transferido al grupo hidroxilo de un residuo de serina del centro activo. Este intermediario es rápidamente hidrolizado en el caso de las β -lactamasas, mientras que en las DD-peptidasas es en general bastante estable (Herzberg y Moulton, 1987; Kelly y col., 1986; Joris y col. 1988; Gibson y col., 1990; Ellerby y col., 1990). Se ha propuesto que las BLA siguen un mecanismo catalítico

similar, mediante la formación de un intermedio acil-enzima, en el que interviene un residuo de serina del centro activo. Sin embargo, la BLA no hidroliza el enlace amida del anillo β -lactámico, sino el que une los restos ácido y amino de la molécula de penicilina (Konecny, 1981).

En cuanto a enzimas que presenten un mecanismo catalítico similar, resaltar el grupo de las serín-proteasas (Blow, 1976; Kraut, 1977; Huber y Bode, 1978). Este grupo de enzimas se caracteriza por la presencia de un residuo de serina esencial en la catálisis. Se han englobado dentro de este grupo a dos familias de enzimas con un mecanismo de acción similar, que sorprendentemente, no presentan otro tipo de similitudes, y constituyen uno de los principales ejemplos de evolución convergente. Una de estas familias, está representada por la subtilisina bacteriana, y la otra, por la tripsina. Esta última familia ha sido mucho más estudiada, e incluye la tripsina, la quimi tripsina y la elastasa, además de otras enzimas menos caracterizadas, pero no por ello menos importantes, que participan en el proceso de coagulación sanguínea y activación del complemento, o proteínas que participan en otros procesos como la maduración de fagos, fertilización, etc (Creighton, 1984).

Atendiendo al mecanismo general de catálisis que presentan los diferentes grupos mencionados, es decir, la unión del ligando a la enzima, la acilación, y la desacilación, se podría pensar en la existencia de una superfamilia de serín-acil-transferasas o serín-enzimas. En base a las homologías y a los alineamientos de secuencias, Joris y col. (1988) han propuesto que, aunque la distancia evolutiva puede variar considerablemente, las DD-peptidasas y β -lactamasas son miembros de una única familia de serín-enzimas distinta de las clásicas familias de la tripsina y de la subtilisina. Estos estudios han puesto de manifiesto la existencia de siete cajas de secuencias conservadas. Aunque los resultados disponibles de cristalografía de rayos-X, derivatización química y mutagénesis dirigida, no permiten inferir a ciencia cierta el significado funcional de estas cajas, sí indican la existencia de un domino común de interacción con el núcleo β -lactámico de la penicilina, que se conserva en todas estas proteínas (Joris y col. 1988).

Oliver y col. (1985) sugirieron la similitud existente entre cierta región de la subunidad α de la PGA de *E. coli* y la región que contiene la serina catalítica de las PBPs (figura 2). Sin embargo, aún no se ha realizado una exhaustiva comparación de secuencias, entre los miembros de los diferentes grupos de las β -lactamasas y de las PBPs, con proteínas del grupo de las BLA. Con objeto de estudiar la relación evolutiva entre ellos, así como para identificar residuos conservados que pudieran ser interesantes en cuanto a la estructura o funcionalidad de la PGA, se realizó un alineamiento con las secuencias de PBPs, β -lactamasas y BLA. Para llevar a cabo esta comparación de secuencias, se creó una librería con las secuencias siguientes: i) β -lactamasas (16 de tipo A, 3 de tipo B, 5 de tipo C, 1 de tipo D); ii) PBPs (4 de alto peso molecular y 3 de bajo peso molecular) y iii) las 13 BLA indicadas en la figura 6. Para realizar los alineamientos y la comparación, se empleó un algoritmo desarrollado por Lipman y Pearson (1985),

utilizando el programa FASTP. No se van a detallar los porcentajes de similitud obtenidos al comparar cada una de las secuencias con las demás, pues sería extenso, pero cabe destacar que no se han encontrado dominios conservados entre las BLA, las β -lactamasas y las PBPs. Sin embargo, se encontraron interesantes similitudes entre las BLA, cuyo alineamiento se muestra en la figura 6, que hacen pensar en la existencia de un origen ancestral común para los miembros de este grupo.

Por tanto, la existencia de un dominio común de unión de penicilina, que sea también común a todas las serín-enzimas que unen penicilinas, es decir, PBPs, β -lactamasas y BLA, no podrá demostrarse hasta que se disponga de la estructura tridimensional de todas estas proteínas. Los resultados obtenidos, muestran que los residuos que son esenciales en PBPs y β -lactamasas, no juegan un papel importante en los procesos catalizados por las BLA, dentro de las cuales se encuentra la PA. Si bien su participación en la unión del sustrato pudiera estar conservada, la evolución podría haber favorecido la aparición de otro dominio catalítico en las BLA que se localizaría en las proximidades del nuevo enlace a hidrolizar. Posiblemente, se haya conservado mejor la estructura tridimensional que la secuencia, lo que implicaría que los cambios en la composición de aminoácidos han sido tales que, para conservar la función, han mantenido las principales características estructurales de la molécula.

Se ha observado que la estructura terciaria de proteínas homólogas se ha conservado mejor, a lo largo de la evolución, que la estructura primaria, y mucho más todavía que la secuencia de nucleótidos. Un ejemplo claro es la familia de las globinas (Dickerson y Geis, 1983). El plegamiento de las globinas está codificado por diferentes secuencias de aminoácidos, difiriendo unas de otras hasta un 86% (130 de 150 residuos). Sin embargo, su similitud en cuanto a conformación, apoya la actual suposición de que proceden de un ancestro evolutivo común.

Cuando los organismos divergen en el curso de la evolución, sus genes acumulan gradualmente mutaciones que originan proteínas bastante diferentes en secuencia. A mayor divergencia, menor similitud de secuencia. La frecuencia de las mutaciones es alta en los sitios irrelevantes en el plegamiento, estabilidad o propiedades catalíticas. Frecuentemente, estos sitios suelen localizarse en zonas de las cadenas polipeptídicas expuestas a la superficie. Los residuos localizados hacia el interior suelen estar más conservados y presentar una naturaleza no polar. Ya que la mutación durante la evolución es un proceso al azar, también se producen sustituciones que afectan a propiedades funcionales. Estas serán toleradas sólo cuando no originen una desventaja para el organismo. Por tanto, los aminoácidos más importantes, como aquellos implicados en catálisis, se encuentran altamente conservados. Las inserciones y deleciones tienden a ocurrir en las regiones de unión de las unidades de estructura secundaria, que se encuentran en la superficie de la proteína, y provocan menores perturbaciones en el interior. Normalmente, en las moléculas divergentes, los elementos de estructura secundaria se organizan con una similar topología tridimensional.

En relación con las homologías de secuencias encontradas entre los diferentes tipos de BLA (figura 6), considerando la similitud en su estructura molecular (tabla 6), y en su proceso de maduración (figura 4), se podría afirmar que las BLA han surgido de un proceso de evolución divergente. La comparación de la secuencia de proteínas que proceden de un ancestro común, puede revelar información acerca de residuos potencialmente importantes en las propiedades funcionales de las enzimas. Esta característica se ha empleado para llevar a cabo el diseño de mutantes, que permitieran desvelar cuales son los dominios o residuos claves, en el reconocimiento del sustrato o en la catálisis de la PGA de *K. citrophila*.

Ya que la naturaleza de las interacciones entre las PGA y la cadena lateral de la Penicilina G presenta un caracter altamente hidrofóbico, los residuos implicados en la unión del sustrato debieran tener un caracter igualmente hidrofóbico. En cuanto a la especificidad de las GLA, es mayor por sustratos que contienen ácidos dicarboxílicos en la cadena lateral de la penicilina, tales como ácido succínico, glutárico y adípico. Esto sugiere una unión de caracter más polar que en el caso de las PGA, y por tanto, podría estar involucrado en la unión del sustrato un residuo cargado positivamente para compensar su carga negativa.

Para llevar a cabo los primeros estudios de mutagénesis, se seleccionó de entre las diferentes regiones que mostraron similitud en al menos 11 de las secuencias, la región de la subunidad α comprendida entre los residuos Arg37 y Ser75 (según la numeración de la secuencia completa del precursor de la PGA de *K. citrophila*, figura 6). Esta región mostraba algunos residuos muy conservados en casi todas las secuencias, así como residuos específicamente conservados en las PGA y en las GLA. Por lo tanto, podría corresponder a un dominio estructural o funcional importante para las BLA, donde alguno(s) de el(los) residuo(s) podría ser responsable de la diferencia de especificidad entre las PGA y las GLA. De hecho, dentro de esta región el cambio Val62Leu, en la GLA de *Pseudomonas* sp. GK16, supuso un cambio en su especificidad de sustrato (Quax y col. 1991). En esta región, también se localizaba una de las dos histidinas más conservadas, la His44, que podría desempeñar el papel de la His de la triada catalítica (Ser-His-Asp) presente en las serín-proteasas (Polgar y Halasz, 1982).

Este estudio se realizó antes de conocerse la estructura tridimensional de la PGA de *E. coli* (Duggleby y col., 1995). Una vez resuelta será necesario localizar la región Asp37-Ser75, dentro de la estructura global de la enzima. Esto permitirá determinar con exactitud la importancia que pueda tener esta región en la unión del sustrato. Estos estudios de modelización sobre la estructura terciaria de la PGA, no han podido realizarse debido a que dicha estructura no está accesible en la base de datos en la que se encuentra. Solamente se puede aproximar su localización dentro de la estructura tridimensional de la PGA, en base a los datos mostrados en la figura 3. Considerando la disposición de residuos indicada en el pie de dicha figura, la zona Arg37-Asp49 se localizaría dentro de la región N-terminal de la subunidad α que está formando un " β -

sandwich" con gran parte de la subunidad β (en rojo). Por otro lado, la zona Thr50-Ser75, se situaría en una de las seis hélices que se organizan en forma de anillo (azul turquesa).

Las estrategias utilizadas para obtener mutantes de PGA de *K. citrophila*, con capacidad de hidrolizar sustratos tales como adipil-, glutaril-, y aminoadipil-L-leucina, que permitieran identificar el(los) residuo(s) responsables, no rindieron los resultados deseados. Mediante la mutagénesis al azar mediante PCR, sólo se obtuvo un mutante, el clon HB101(pYKD60R19), que mostraba menor capacidad catalítica para hidrolizar penicilina G, aunque mostraba íntegra su capacidad de hidrolizar NIPAB. La secuenciación del plásmido pYKD60R19 reveló la presencia de los cambios Asp49Gly y Tyr59His. El Asp49 sólo se conserva en cuatro de las secuencias comparadas (figura 6), tres de PGA, y una de GLA, por lo que no parece muy específico. Sin embargo, la Tyr se conserva en todas las PGA comparadas, siendo una Phe el residuo correspondiente en el alineamiento para la mayoría de las GLA. Ninguna de las mutaciones parece tener repercusiones estructurales significativas, como se deduce de la predicción de estructura secundaria de la zona donde se localizan (figura 8). Sin embargo, habrá que esperar a localizar estos residuos en la estructura tridimensional de la proteína, para poder determinar su papel.

Al mutagenizar la zona utilizando un oligonucleótido degenerado, sólo se obtuvieron enzimas con más de ocho residuos mutagenizados. Los residuos de la enzima nativa fueron cambiados sin mantener en ninguna de la posiciones un determinado grado de similitud, por lo que la disminución de actividad que mostraban sobre penicilina G, posiblemente se deben a un cambio en la estructura de la proteína. Sin embargo, al no poder precisar ni determinar la extensión de este cambio estructural dentro de la conformación global de la enzima, no se puede concluir si este segmento de la PGA de *K. citrophila*, es importante en el reconocimiento del sustrato o bien en el mecanismo de catálisis.

Ya se han mencionado las similitudes del mecanismo catalítico propuesto para la PGA con el mecanismo postulado para las serín-proteasas, ambas hidrolizan enlaces amidas y ésteres, utilizando un residuo de serina catalítico, y mediante la formación de un intermedio acil-enzima. Esto sugería que la PGA, al igual que estas enzimas, podría utilizar una triada catalítica (Ser-His-Asp). Otras enzimas diferentes de las serín-proteasas también presentan una triada catalítica, por ejemplo, una triacilglicerol lipasa (Brady y col., 1990), una lipasa pancreática humana (Winkler y col., 1990) y una dipeptidil-peptidasa de ratón (David, y col., 1993). Asimismo, la dependencia con el pH, de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de penicilina G por la PGA de *K. citrophila*, desveló la presencia de un residuo de histidina implicado en la catálisis, bien directa o indirectamente (Martín y col., 1993a). Por tanto, se buscaron en el alineamiento de las BLA (figura 6) aquellos residuos que pudieran corresponderse con los de la triada catalítica. Está bien determinado que la serina catalítica se localiza en el extremo N-

terminal de subunidad β de la PGA de *K. citrophila* y de *E. coli* (Martin y col. 1991; Slade y col. 1991). Como ya se ha mencionado anteriormente, hay dos histidinas muy conservadas entre las BLA, que corresponden a las His44 y His807 de la secuencia de la PGA de *K. citrophila*. Ambas se localizan en regiones altamente conservadas, sobre todo la His44. Respecto del tercer residuo de la triada catalítica propuesta, hay tres candidatos en la subunidad β : Asp472, Asp614 y Asp810, y uno en la subunidad α : Asp38. Este último, está contenido en la región conservada que se utilizó para realizar los estudios de mutagénesis, cercano en secuencia a la His44. El Asp810 también se sitúa en otra región conservada, cercana en secuencia a His807. Sin embargo, los datos criatalográficos obtenidos por difracción de rayos X (figura 3), parecen indicar que la catálisis se lleva a cabo mediante un mecanismo atípico, con la participación única de la serina N-terminal de subunidad β (figura 54). No se ha detectado ninguna histidina adyacente al residuo de Ser catalítico, lo cual supondría que a diferencia de las serín-proteasas, las PGA no necesitarían de un residuo de histidina que aumentara la nucleofilia del grupo hidroxilo de la serina catalítica. En este sentido, se asemejaría más a las β -lactamasas, donde ningún residuo de histidina se conserva de forma invariable. Incluso se ha encontrado una β -lactamasa que no contiene ningún residuo de histidina (Dehottay y col., 1987)

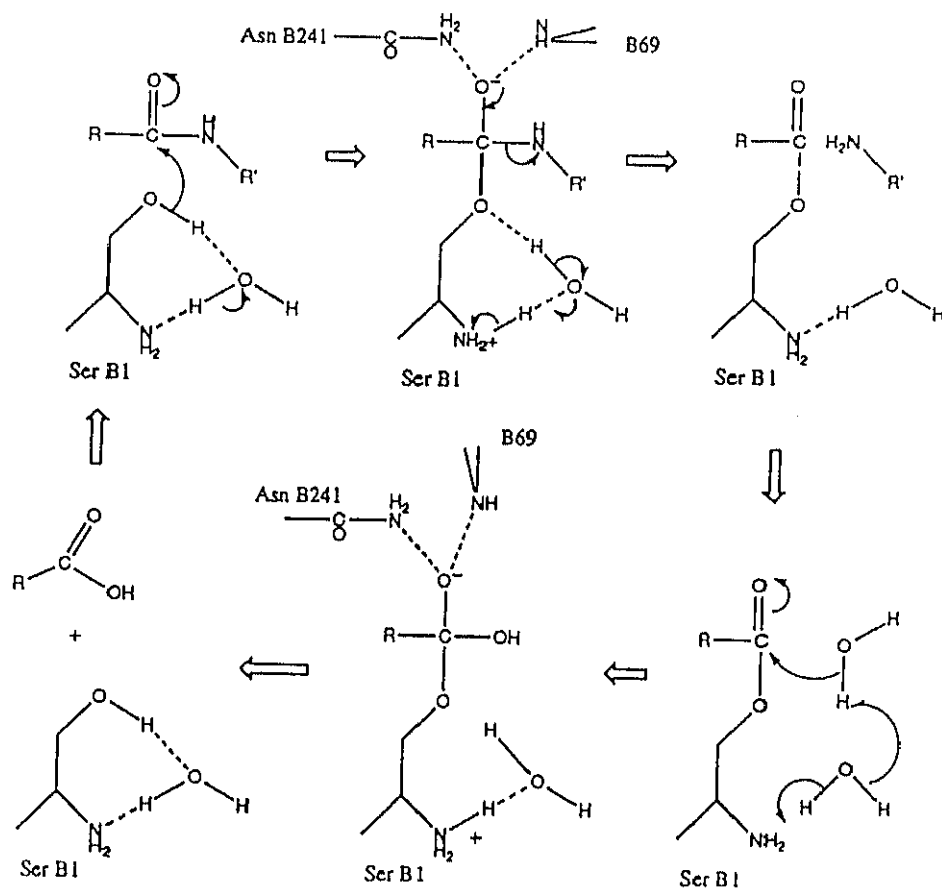


Figura 54. Mecanismo catalítico de la PGA de *E. coli*. Los aminoácidos que participan en el mecanismo que se ha postulado a partir de los datos cristalográficos (Duggleby y col. 1995) son: la SerB1, la AsnB241 y la AlaB69, todos ellos pertenecientes a la subunidad β . El grupo α -amino de la SerB1 aumenta su nucleofilia y sustituye a la His que participa en el mecanismo catalítico establecido para las serín-proteasas. La desacilación va acompañada del ataque nucleofílico de una molécula de agua que puede ser indirecto, como se muestra en esta figura, o directo, mediante la interacción con el grupo α -amino. Además de las interacciones mostradas, se asume que existe una interacción del grupo hidroxilo de la serina catalítica con el nitrógeno del enlace peptídico de la GlnB23, que se mantiene durante toda la reacción enzimática. La numeración de los residuos indica su posición en las subunidades α y β maduras (Duggleby y col. 1995).

2. CAMBIO DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO A TRAVES DE PRESION SELECTIVA.

Utilizando un procedimiento desarrollado para clonar los genes *pac* (García y Buesa, 1986), se han aislado mutantes de *K. citrophila* que hidrolizan nuevos sustratos. Aunque se han utilizado procedimientos similares para generar mutantes de PGA de *E. coli* y *P. rettgeri* (Daumy y col. 1985a, b; Forney y col., 1989; Forney y Wong, 1989) sólo se ha obtenido una información limitada sobre la naturaleza de las mutaciones que alteraron la especificidad de sustrato (Williams y Zuzel, 1985).

Como ya se ha indicado previamente, la PGA es un heterodímero que se origina desde un precursor común, siendo ambas subunidades (α y β) necesarias para que la enzima sea activa (Daumy y col. 1985b, Schumacher y col. 1986). La subunidad β contiene el residuo de serina que está directamente implicado en la catálisis (Martín y col. 1991, Slade y col. 1991), mientras que se ha demostrado que la subunidad α tiene un importante papel en la determinación de la especificidad de sustrato por la cadena lateral de las penicilinas (Daumy y col. 1985).

La PGA muestra mayor especificidad por la cadena lateral de la molécula de penicilina, así la sustitución de 6-APA por 7-ACA tiene pocos efectos en la actividad enzimática (Huang y col. 1963). Además, la PGA es también capaz de hidrolizar otros ésteres o amidas de fenilacético (Margolin y col. 1980). Aquellos sustratos que presentan un resto acilo de carácter hidrofóbico son hidrolizados más eficientemente que los que llevan grupos funcionales ionizables o polares. Así, la enzima puede utilizar como sustratos diferentes amidas que contienen como cadena lateral caproil, malonil o 2-tienilacetil, mientras que es incapaz de hidrolizar sustratos con glutaril, adipil o amino adipil (Margolin y col. 1980, Huang y col. 1963).

Como se ha descrito anteriormente se ha conseguido obtener un mutante capaz de hidrolizar adipil- o glutaril-L-leucina mediante mutagénesis *in vivo*. La secuenciación del DNA ha permitido localizar la mutación responsable del cambio de especificidad de sustrato como una única transversión. Esta mutación origina un cambio Phe360Val. Debido a la ausencia de datos cristalográficos, no era fácil explicar como esta mutación produce el cambio en la especificidad de sustrato. No se observó ningún cambio significativo en los espectros de dicroísmo circular de la proteína, y los análisis de predicción de estructura secundaria no mostraron tampoco una alteración (figuras 16A y 17). Aunque no se podía descartar la posibilidad de que la Phe360 jugara un papel esencial en la estabilización de la estructura terciaria a través de interacciones hidrofóbicas, se sugirió que su cadena lateral podría tener un importante efecto en el centro activo de la enzima.

Se ha propuesto que la PGA sigue un mecanismo de ajuste inducido, donde la interacción de la parte ácida del sustrato con el centro activo induce una reorganización conformacional de la proteína (Martín y col. 1990). Por tanto, los aminoácidos

implicados en la estabilización del primer estado de transición así como en el complejo enzima-sustrato deben jugar un papel crítico en el equilibrio de asociación y constante de especificidad de la enzima. Este argumento se ha propuesto para explicar el cambio de especificidad que presenta el mutante Met168Ala de la PGA de *K. citrophila* (Martín y col. 1990; Prieto y col. 1990). El centro activo de la PGA parece estar constituido por una estructura compleja mantenida por dominios hidrofóbicos que son reconocidos por el sustrato de acuerdo a un mecanismo de ajuste inducido (Martín y col. 1990). El residuo Phe360 podría estar implicado en el mantenimiento de estos dominios hidrofóbicos.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de varias fenilacetil y glutaril acilasas muestra que la región alrededor de la Phe360 está muy conservada (figura 16B). Este aminoácido se conserva en la misma posición en cinco acilasas, pero, es remplazado por una prolina en la PGA de *A. faecalis* (Ljubijankic y col. 1992). La presencia de una prolina en esta posición refuerza los resultados de predicción de estructura secundaria, que indican que esta región presenta estructura no ordenada, y por tanto, el cambio de la Phe360 por cualquier otro aminoácido no justificaría un cambio estructural responsable del cambio de la especificidad de sustrato.

Recientemente se han identificado los residuos localizados en el "bolsillo catalítico" de la PGA de *E. coli* (Duggleby y col., 1995). Debido al elevado grado de similitud encontrado con la PGA de *K. citrophila*, se podría asumir una disposición estructural similar. Este hecho permitirá localizar al residuo de Phe360, ya que se corresponde con una Phe en la misma posición en la PGA de *E. coli* (figura 16B). Cercanos en la secuencia primaria, se han identificado residuos importantes en la catálisis: Ala358, Ser356 y Phe346. La Ala358 se sitúa en la boca del "bolsillo catalítico", mientras que la Ser356 y la Phe346 se localizan en el "bolsillo catalítico". Por tanto, aunque el cambio de la Phe360Val no parece provocar cambios significativos en la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína, es posible que se produzca una alteración en la estructura del centro activo, cambiando la accesibilidad del sustrato y la catálisis. El residuo de Phe360 podría estar localizado en las proximidades de la estructura tipo barril β , que comprende el dominio B 74-B 142 (figura 3).

La observación de que la hidrólisis de adipil- o glutaril-L-leucina se produce más eficientemente a pH 5 está en concordancia con los resultados obtenidos previamente por Forney y col. (1989), pero no existe una explicación sencilla de este hecho. A este pH el grupo carboxilo libre del adipico o del glutárico (pK_a alrededor de 4,7) (Fasman, 1976) no está completamente ionizado, y no se puede descartar que tenga un efecto en una parcial neutralización de la carga negativa. Por otro lado, se ha mostrado que a pH 5 se produce un pequeño cambio conformacional, que de acuerdo con el mecanismo de ajuste inducido, podría modificar el reconocimiento del sustrato. Así, a este pH, la interacción de la carga negativa del grupo carboxilo libre con un aminoácido cargado positivamente en el centro activo, estabilizaría el estado de transición. Los estudios cinéticos y

termodinámicos basados en la dependencia del pH de V/K_m para la hidrólisis de penicilina G por la PGA de *K. citrophila* demostraron la existencia de dos valores de pK de 4,6 y 9,5 (Martín y col. 1993a). Estos estudios atribuyeron el valor de pK_1 a una histidina, sugiriendo que la alta hidrofobicidad postulada para el centro activo del enzima es responsable de este bajo valor de pK para la histidina. La forma desprotonada de este aminoácido podría actuar como un aceptor de protones que estabilizaría la amida mediante la formación de un puente de hidrógeno (Martín y col. 1993a). De acuerdo con esta observación, esta histidina debería estar parcialmente protonada a pH 5, este factor contribuiría a la estabilización del carboxilato de las amidas de glutárico o adípico. Sin embargo, se han encontrado mutantes de PGA que hidrolizan sustratos con cadenas laterales no ionizables, tales como fenoxiacetil-, valeril- o caproil-L-leucina, con mayor eficiencia a pH 5 que a pH 8. En estos casos, no se puede justificar a través del efecto de pH la estabilización del sustrato vía interacciones iónicas. Además, es importante considerar que una vez resuelta la estructura tridimensional de la PGA de *E. coli*, no se ha localizado ningún residuo de histidina cercano al centro activo (Duggleby y col., 1995).

Aunque el mutante de PGA fue capaz de hidrolizar adipil- y glutaril-L-leucina, no fue capaz de hidrolizar otros derivados con cadena lateral polar como glutaril-7-ACA. El mutante de PGA obtenido por Forney y Wong (1989), que hidroliza D-(-)- α -aminofenilacetil-L-leucina eficientemente, fue menos activo sobre cefalexina que la enzima nativa. Los mutantes obtenidos por Forney y col. (1989) que mostraron actividad sobre glutaril-L-leucina no se ensayaron sobre glutaril-7-ACA, y por tanto, no se pueden comparar los resultados. El único mutante de PGA que se ha ensayado con derivados de penicilina es el mutante Met168Ala de la PGA de *K. citrophila* que fue capaz de hidrolizar ácido 6-bromohexanoil-6-aminopenicilánico (Prieto y col. 1990). Este mutante obtenido por mutagénesis dirigida es equivalente al mutante BroA de *E. coli* (Daumy y col. 1985b, William y Zuzel, 1985). Los mutantes de PGA de *E. coli* se seleccionaron utilizando amidas primarias como única fuente de nitrógeno (Daumy y col. 1985b). Aparentemente, el uso de amidas de adipil-L-leucina como única fuente de L-leucina, en vez de la adipamida como única fuente de nitrógeno, determina la selección de enzimas con nuevas actividades enzimáticas que pierden su capacidad original de hidrolizar eficientemente los núcleos de penam y cefem. El mutante de PGA de *K. citrophila* Phe360Val hidroliza las amidas de fenilacético con igual eficiencia que la enzima nativa, o algo menor, dependiendo de la estructura de la amina del sustrato.

Finalmente, se puede concluir que la presión selectiva es un método útil para modificar la especificidad de sustrato de la PGA, pero, atendiendo al mecanismo de ajuste inducido del enzima, un cambio que favoreciese la unión de una nueva cadena lateral podría alterar el amplio espectro de aminas reconocidas por la enzima nativa. Por tanto, el diseño de protocolos experimentales para el aislamiento *in vivo* de mutantes de

PGA capaces de hidrolizar nuevas penicilinas y cefalosporinas debería considerar la utilización de estos compuestos para realizar la presión selectiva.

3. CARACTERIZACION DE NUEVOS SUSTRATOS. ESTUDIO DEL MECANISMO CINETICO.

Se ha propuesto que la hidrólisis de la penicilina G por la PGA transcurre a través de la formación de un intermedio covalente acil-enzima, que posteriormente transfiere el grupo fenilacetil a una molécula de agua (Konecny y col., 1993; Prieto y col., 1990). El mecanismo catalítico de las serín-proteasas, ampliamente estudiado, se desarrolla a través de una secuencia similar de reacciones (Milstein y Fife, 1969). Ambos tipos de enzimas presentan la capacidad de hidrolizar amidas, así como ésteres, mediante el mismo mecanismo. La formación del intermedio acil-enzima de la hidrólisis catalizada por las serín-proteasas ha sido bien caracterizado mediante el empleo de técnicas de flujo detenido (Gutfreund y Sturtevant, 1956; Milstein y Fife, 1969; Hiroahara y col., 1977). Sin embargo, este estudio no ha sido realizado con las PGA, ya que hasta la fecha sólo se han analizado sus cinéticas en el estado estacionario, lo que aporta una información muy limitada acerca del mecanismo catalítico.

Con objeto de profundizar en el conocimiento del mecanismo catalítico de la PGA de *K. citrophila*, se ha estudiado la formación del intermedio acil-enzima, y se han determinado las constantes cinéticas de acilación y desacilación. Este estudio a requerido la caracterización de nuevas actividades enzimáticas, ya que los sustratos clásicos empleados para el análisis cinético en el estado estacionario de la PGA, no resultaban adecuados en el estado pre-estacionario.

Sorprendentemente, el *p*-nitrofenilacetato y otros ésteres de *p*-nitrofenol, resultaron ser sustratos para la PGA (tabla 12). Obviamente, el ácido acético, propiónico, butírico o valérico no son estructuras de acilo altamente hidrofóbicas, y por consiguiente, sus acetil derivados, ésteres o amidas, no deberían ser considerados como potenciales sustratos de la PGA. Aunque inicialmente se planteó la posibilidad de estar ante la actividad de una esterasa contaminante de la preparación de PGA, varios experimentos han demostrado que la PGA es ciertamente la responsable de la hidrólisis de los ésteres de *p*-nitrofenol. En este sentido, resultó muy convincente la observación de que la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato fuera inhibida equimolecularmente por PMSF (figura 20A), pero no lo fuera por diisopropilfluorofosfato (DFP). Aunque ambos compuestos son inhibidores de serín-proteasas, se ha demostrado que el DFP sólo no causa inhibición de la PGA, mientras que el PMSF, que tiene una estructura similar a la de cadena lateral de la penicilina G, inhibe totalmente la actividad PGA en concentraciones equimoleculares (Kutzbach y Rauenbush, 1974; Prieto y col., 1990; Shvyadas y col., 1977; Siewinski y col., 1984). Además, la penicilina G sulfóxido, la penicilina G y el ácido fenilacético, que son inhibidores específicos de la PGA fueron también inhibidores eficientes de la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato (figura 20B, C y D). La inhibición ejercida por el ácido fenilacético se ha demostrado que es de tipo

competitivo (figura 21). El perfil de pH de la hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato es idéntico al obtenido con penicilina G (figura 22).

Los resultados obtenidos indican que el *p*-nitrofenilacetato y ésteres relacionados, pueden interaccionar productivamente con la enzima, presumiblemente con el grupo hidroxilo de la serina catalítica del centro activo, para formar un acil-derivado que es accesible a una posterior ataque por agua. La presencia de un grupo saliente muy efectivo podría contribuir a disminuir el valor de K_M de un sustrato, por otro lado, pobremente unido, y a una acumulación suficiente de intermedio acil-enzima que condujera a una hidrólisis significativa en el estado estacionario. Asimismo, es posible que interacciones no covalentes entre la enzima y el grupo acetilo, u otros más largos, pudieran contribuir a inducir los cambios conformacionales necesarios para ser acomodados en el centro activo de la PGA, y por tanto, para la catálisis. Mientras tanto, el grupo acilo más pequeño del *p*-nitrofenilformato, que no es sustrato ni inhibidor, sería incapaz de establecer tales interacciones (tablas 12 y 14). Por otro lado, el fenilacetato, que es un éster menos reactivo, es sin embargo mejor sustrato que el *p*-nitrofenilacetato. La posición del grupo nitro, también parece delimitar la disposición en el centro activo, siendo más desfavorable cuando se localiza en posición *orto*. La ausencia de actividad sobre el *p*-nitrofeniltrimetilacetato sugiere que la unión al centro catalítico está limitada por restricciones estéricas. Estas propuestas están apoyadas por los datos de especificidad obtenidos utilizando diferentes compuestos como inhibidores (tabla 14). Aunque el modo de unión del *p*-nitrofenilacetato y los otros ésteres del *p*-nitrofenol no se conoce, el grupo aromático podría ocupar el "bolsillo" catalítico, mejor que el resto de acilo.

Una vez demostrada la especificidad de la hidrólisis de la PGA sobre esta familia de sustratos, se determinaron los parámetros cinéticos del proceso en el estado estacionario, para alguno de los miembros de esta familia. Los datos obtenidos de K_M y k_{cat} para la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato, indicaron que la PGA presenta para este sustrato, una K_M similar a la que se observa para penicilina G, siendo la hidrólisis 50 veces más lenta (tabla 15). Estas características hacen que este sustrato sea idóneo para realizar el estudio en el estado pre-estacionario. Asimismo, se determinaron los parámetros cinéticos en el estado estacionario de la ADL, para algunos ésteres de *p*-nitrofenol (tabla 16). Los datos indican que la hidrólisis es más lenta, pero se lleva a cabo con un valor de K_M similar.

Estos resultados demuestran que la PGA es capaz de hidrolizar una nueva familia de sustratos, que además proporcionan una excelente herramienta para analizar su mecanismo catalítico en el estado pre-estacionario. Además, este descubrimiento plantea una nueva perspectiva acerca del papel fisiológico de la PGA en la naturaleza, ya que los derivados de fenol podrían ser utilizados como una fuente alternativa de carbono por los microorganismos productores de PGA. En este sentido, se ha demostrado recientemente que los fenoles son sustratos de una hidroxilasa que posee un amplio espectro de

especificidad de sustrato que está codificada por el operon *hpaBC* localizado a corta distancia del gen *pac* de la PGA (Prieto y García, 1994).

La hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato en el estado pre-estacionario, mostró una cinética bifásica, característica de la formación de un intermedio covalente acil-enzima (figura 19). El análisis cinético de esta reacción ha permitido caracterizar el intermedio acil-enzima, así como determinar las constantes de acilación (k_2), desacilación (k_3) y de unión (K_S) (tabla 17). Se ha caracterizado la formación del intermedio acil-enzima para la PGA nativa y mutante ADL. Los resultados obtenidos indican que durante la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato, se produce una unión rápida del sustrato ($K_S = 0,77$ y $0,84$ mM, para PGA y ADL, respectivamente), seguido de la formación del intermedio acil-enzima ($k_2 = 58$ y $9,3$ s⁻¹, PGA y ADL, respectivamente) y la subsecuente hidrólisis del intermedio ($k_3 = 0,9$ y $0,051$ s⁻¹, PGA y ADL, respectivamente). Para ambas enzimas la desacilación es la etapa limitante del proceso. Sin embargo, la relación entre las constantes de acilación y desacilación (k_2/k_3) no es igual en los dos casos, siendo tres veces mayor en el caso de la PGA nativa. Esto podría indicar que la mutación Phe360Val tiene mayor repercusión sobre el proceso de hidrólisis del intermedio acil-enzima, que sobre su formación. Quizás en este sentido, el mecanismo catalítico de las PGA, se asemeje más al de las β -lactamasas, donde el proceso de desacilación, no es simplemente la etapa inversa del proceso de acilación (Herzberg y col., 1991; Strynadka y col., 1992).

Durante la hidrólisis de *p*-nitrofenilacetato por la PGA nativa y mutante, el FA inhibió la parte exponencial de las cinéticas bifásicas en ambos casos (figura 30). Los valores de K_i obtenidos a partir de las cinéticas realizadas en el equipo de flujo detenido (tabla 17), son similares a los valores de K_i , calculados para la inhibición por ácido fenilacético de la hidrólisis de NIPAB (tabla 11). Este resultado es consistente con la interacción de ambos sustratos con el mismo residuo catalítico.

Los estudios recientes de cristalización de la PGA, han determinado la estructura de la enzima acomplejada con ácido fenilacético y con PMSF, localizando el sitio de unión de la cadena lateral del sustrato (figura 5). El resto fenilo de estos inhibidores se localiza en un bolsillo hidrofóbico constituido por varias cadenas laterales aromáticas e hidrofóbicas (Duggleby y col. 1995). Las interacciones moleculares que se establecen en el transcurso de la catálisis, se pueden deducir del análisis de los complejos enzima-inhibidor, mencionados anteriormente. A partir del complejo PGA-PMSF (figura 5a) se han deducido las interacciones del intermedio tetraédrico, en el cual el grupo sulfonilo tetraédrico se asemeja a la estructura de un hemiacetal. El complejo PGA-FA (figura 5b) muestra que el O γ de la Ser del extremo N-terminal de la subunidad β (Ser B1), está en una posición favorable para atacar el carbono carbonílico.

A diferencia de la triada catalítica de las serín-proteasas, no se observa un residuo de histidina adyacente al centro activo, por lo que se ha propuesto que la nucleofilia de la Ser catalítica debe ser promovida por un mecanismo diferente (Duggleby y col., 1995). Es necesaria la presencia de una base adyacente a la serina catalítica para aumentar la

nucleofilia de su grupo hidroxilo. El mejor candidato parece ser el grupo α -amino libre de la propia Ser catalítica, que podría aumentar su nucleofilia directamente, o a través de una molécula de agua (figura 54). El resultado del ataque nucleofílico del O γ de la Ser catalítica (Ser B1) al carbono carbonílico de la penicilina G, originará un intermedio tetraédrico oxianiónico, estabilizado por las interacciones con los enlaces peptídicos de los residuos de Ala B69 y Gln B23, y con el N δ del Asn B241, creándose un hueco oxianiónico como en las serín-proteasas (Robertus y col., 1969) (la numeración corresponde a las subunidades maduras de la PGA de *E. coli*). Este intermedio tetraédrico evoluciona para formar el intermedio acil-enzima, liberándose el 6-APA. El acil-enzima es ahora susceptible de ser atacado por una molécula de agua para formar un segundo intermedio tetraédrico, estabilizado de la misma manera que el primero, que originará enzima libre y ácido fenilacético.

4. REGULACION Y EXPRESION GENICA.

La formación de PGA activa, igual que la de la mayoría de las BLA, es un proceso que presenta una compleja regulación la cual aun no se ha esclarecido en detalle a nivel molecular. Aunque se conocen parte de los factores que intervienen en la producción de la PGA de *E. coli*, por ejemplo, temperatura, nivel de oxígeno, represión catabólica e inducción por FA, no parece claro que estos factores actúen de la misma manera sobre la producción de la PGA de *K. citrophila*. Con objeto de determinar las similitudes y diferencias, que puedan existir en cuanto a la regulación y expresión de la PGA de estas dos procedencias, se ha estudiado la regulación a nivel transcripcional y postraducional.

El primer paso en el estudio de la transcripción del gen *pac* de *K. citrophila* ha consistido en la caracterización de su promotor. Aunque el promotor del gen *pac* de *E. coli* había sido estudiado previamente por Valle y col. (1986), se ha repetido este estudio con objeto de cuantificar de forma precisa las posibles diferencias entre ambos promotores. Mediante la secuenciación de la región que precede al ATG del gen *pac* de *K. citrophila*, y su comparación a la región correspondiente del gen *pac* de *E. coli* se han podido establecer las primeras diferencias (figura 33). Para comprobar que esta región contenía el promotor se han realizado distintas fusiones con genes trazadores (figura 34), y se ha estudiado si el patrón de expresión de dichas fusiones, se correspondía con el patrón de expresión de los genes *pac* de *E. coli* y de *K. citrophila*.

El primer aspecto que se ha analizado ha sido la respuesta a la inducción por FA. Era conocido el hecho de que mientras la cepa de *E. coli* ATCC11105 necesita FA en el medio de cultivo para producir PGA (figura 32A), la de *K. citrophila* no responde a esta inducción (figura 31A). El mismo comportamiento se observó al estudiar la producción de la PGA cuando los genes *pac* de ambas bacterias fueron clonados, y expresados en cepas heterólogas no productoras de PGA (figuras 31B y 32B). La expresión de las fusiones con los genes trazadores corroboraron estos resultados (figuras 35A y 36A), demostrando que la región que se muestra en la figura 33 contiene las secuencias responsables de la expresión del gen *pac*. Por último, la producción de PGA observada en presencia de FA en el clon HB101 (pSKSpac) también apoyó esta hipótesis. Por tanto, es la primera vez que se delimita con esta precisión el promotor del gen *pac* de *K. citrophila*, al mismo tiempo que se confirman los estudios de Valle y col. (1986) sobre el promotor del gen *pac* de *E. coli*.

Resulta interesante, el hecho de que en las cepas recombinantes de *E. coli* HB101, MC1116 y MC4100, que antes de ser transformadas no producen PGA, se hayan obtenido perfiles de inducción por FA similares a los que se obtienen con la cepa salvaje de *E. coli* ATCC11105. Si el efecto inductor del FA estuviera mediado por proteínas reguladoras habría que suponer que los genes reguladores se encuentran presentes en todas las cepas de *E. coli* transformadas. De acuerdo con esta interpretación Merino y

col. (1992) también han sugerido que de existir proteínas que regulen la inducción por FA del gen *pac*, no serían específicas de las cepas productoras. Qiaoling y col. (1992b) ha propuesto que el sistema de inducción opera mediante control negativo. Es decir, el inductor, FA o un derivado, se uniría a un represor inactivándolo, efecto que se traduciría en un aumento de la expresión del gen *pac*. Según estos autores el sitio de unión del represor se localizaría en un fragmento contenido dentro del propio gen *pac* de *E. coli*.

Un dato que complica la interpretación de la inducción por FA es el hecho de que si bien el gen *pac* de *K. citrophila* no se induce en la cepa salvaje, se había observado que al ser expresado en varias cepas de *E. coli* se podía apreciar un cierto efecto inductor (García y Buesa, 1986).

El hecho de que la producción de la PGA de *E. coli* esté sujeta a represión catabólica por glucosa, fue descrito hace tiempo por Kaufmann y Bauer (1964). También se conocía que la síntesis de esta enzima está reprimida por glicerol y fructosa (Szentirmai, 1964). Estudios posteriores realizados con mayor detalle confirmaron el efecto represor de la glucosa (Levitov y col., 1967). Se aislaron mutantes de *E. coli* que tenían dañado el transporte de glucosa y que presentaron una síntesis de PGA parcialmente insensible a la represión por este compuesto (Golub y col., 1973). Según Vojtisek y Slezak (1975b) la desrepresión de la síntesis de PGA en *E. coli* por cAMP, cuando se cultiva en un medio conteniendo glucosa y FA, está asociada a la utilización del inductor. Esto se debe posiblemente a la desrepresión de otras enzimas responsables de la degradación del ácido fenilacético. En estos estudios se comprobó que el lactato se comportaba como una fuente de carbono catabólicamente neutra. Posteriormente, Vojtisek y Slezak (1975c) observaron una represión parcial de la síntesis de PGA en presencia de acetato, comprobando además que la inducción por FA, en un medio con lactato no está influenciada por cAMP.

Los primeros estudios realizados sobre la producción de PGA por la cepa de *K. citrophila* bajo la influencia de diferentes fuentes de carbono y energía, indicaron que se regulaba de manera similar a como sucede en *E. coli*. La sacarosa y los ácidos glutámico y aspártico estimulaban el crecimiento de la cepa y la producción de PGA, mientras que la glucosa, la fructosa, la maltosa y la lactosa inhibían el crecimiento y la producción (Okachi y col., 1972).

Al menos, hay tres posibles vías sobre las cuales podría actuar la glucosa para regular la producción de PGA; i), regulando el gen *pac* a nivel de transcripción; ii) modulando la expresión algún otro gen implicado en el transporte del FA; iii) modulando la expresión de algún gen implicado en la maduración del precursor de la PGA. Con objeto de determinar cual de estas posibles vías tenía lugar, se realizó, en primer lugar, un estudio del efecto de la represión por glucosa a nivel transcripcional. Para ello, se ha determinado la expresión de las fusiones génicas (figura 34) en condiciones de represión catabólica por glucosa (figuras 35A y 36A). Los resultados indican que la glucosa, y el

FA, actúan directamente modulando el nivel de transcripción del gen *pac*. Aunque no se puede descartar que la glucosa pueda ejercer al mismo tiempo un efecto indirecto sobre la regulación de otro(s) factor(es) implicados en el transporte de FA o en el proceso de maduración del precursor de la PGA, no parece que sea éste el mecanismo de acción predominante. Además la represión por glucosa y la inducción por FA, pueden tener lugar simultáneamente.

Por otro lado, se estudió si la represión por glucosa estaba mediada por el complejo CRP-cAMP, ya que no siempre esta represión tiene lugar por este mecanismo. Un ejemplo de este tipo de regulación no dependiente de la formación del complejo podemos encontrarlo en la síntesis de la adenilato ciclasa de *E. coli*. Se ha caracterizado la región reguladora del gen *cya* encontrando dos promotores, P1 y P2. El primero es sensible a represión catabólica, mientras que P2 no responde a la represión por glucosa. Aunque la secuencia de DNA revela la existencia de un sitio consenso de unión de la CRP, no se ha detectado efecto del cAMP (Roy y col. 1983). Otras observaciones han conducido a definir la existencia de una represión catabólica independiente de cAMP (Ulmann y col. 1976; Wanner y col., 1978; Ulmann, 1985; Shaibe y col. 1985; Henkin y col. 1991).

En el caso de los promotores de los genes *pac* de *K. citrophila* y de *E. coli* la represión por glucosa viene mediada por la unión del complejo CRP-cAMP, como puede deducirse de la ausencia de represión catabólica observada al estudiar la expresión de las fusiones génicas en la cepa SBS688 (figuras 35B y 36B). Asimismo, la adición exógena de cAMP contrarrestó el efecto de represión catabólica (figura 39B y 40B), mientras que no tuvo ningún efecto significativo sobre la expresión, en ausencia de glucosa (figura 39A y 40A). El análisis del efecto del cAMP exógeno sobre la represión catabólica ha puesto de manifiesto que el promotor del gen *pac* de *K. citrophila* es capaz de ser inducido por FA en estas circunstancias (figura 39B). Este resultado apunta la posibilidad de que exista una relación entre la unión del complejo CRP-cAMP y el proceso de inducción por FA. En la cepa SBS688 no se observó inducción por FA sobre el promotor del gen *pac* de *E. coli*, ni tampoco sobre el correspondiente de *K. citrophila*. Dado que se ha observado un efecto de inducción por FA sobre ambos promotores en condiciones de represión catabólica (figuras 39B y 40B) cabría esperar que en la cepa SBS688 se observara el mismo fenómeno, ya que al carecer de CRP sería una situación equivalente a la de máxima represión catabólica, independientemente de la fuente de carbono utilizada. Una posible explicación a este hecho, podría encontrarse en la presencia de niveles basales de CRP-cAMP en la cepa MC4100 en condiciones de represión catabólica, que no estarían presentes en la cepa SBS688. Aunque una concentración mínima de cAMP, como la que se encuentra en las células en presencia de glucosa, no sería suficiente para inducir la expresión, podrían encontrarse suficientes moléculas de CPR con una conformación alostérica capaz de interaccionar con el DNA inespecíficamente, modificando la curvatura del DNA para permitir la interacción de

otras proteínas reguladoras de la inducción por FA. Otra posible explicación de este suceso, podría deberse a que la cepa SBS688 llevara mutaciones no definidas que interfirieran con el proceso de entrada a la célula de FA. Tampoco se puede descartar la posibilidad de que la posible proteína reguladora de la inducción por FA estuviera alterada en esta cepa.

La caracterización completa del promotor del gen *pac* de *K. citrophila*, conlleva la identificación del sitio de iniciación de la transcripción. Por medio de la técnica de "primer extension" (PEX), se ha identificado el sitio de iniciación de la transcripción en la posición -76 respecto del ATG (figura 43). Dado que este sitio era distinto de los propuestos previamente por Valle y col. (1986), o por Oh y col. (1987) para el gen *pac* de *E. coli*, se procedió a determinar nuevamente el sitio de iniciación de este gen en nuestro laboratorio. Los resultados han mostrado la presencia de dos posibles sitios de iniciación de la transcripción (figuras 44 y 46). Al analizar los clones portadores de la fusiones génicas, el sitio de iniciación de la transcripción observado se localizaba en la posición -77 respecto del ATG, siendo equivalente al encontrado para el gen *pac* de *K. citrophila*. Este resultado se ha obtenido independientemente de las condiciones metabólicas empleadas (figuras 44 y 45). Sin embargo, al analizar el resultado del PEX utilizando RNA obtenido a partir de uno de los clones en fase estacionaria se pudo observar una banda de menor intensidad en la posición -30 respecto del ATG inicial. Este nuevo sitio de iniciación se corresponde con el propuesto por Valle y col. (1986).

A la vista de estos resultados, se estudio la posible influencia del gen *pac* de *E. coli* sobre la preponderancia de ambos sitios de iniciación. Sorprendentemente, se observo que cuando la región promotora del gen *pac* se encuentra fusionada a su propio gen aparecen dos bandas, correspondiendo ahora la más intensa a la de la posición -30, y la menos intensa a la de posición -77 (figura 46). Este resultado fue más evidente cuando se analiza el RNA de la cepa de *E. coli* ATCC11105, productora natural de actividad PGA. En este caso, se observa una mayor heterogeneidad en el extremo 5' del RNA que comienza en la posición -77. Este hecho se observa frecuentemente cuando la iniciación puede tener lugar en dos residuos próximos (Maizels, 1973).

El promotor del gen *pac* de *K. citrophila* no se comporta igual, ya que al analizar el sitio de iniciación de la transcripción en presencia del gen *pac* correspondiente, se obtiene una única banda a la altura de -76 (figura 46E1). Para explicar estas diferencias se podría especular con la posibilidad de que el gen *pac* de *E. coli* formara estructuras secundarias estables que originaran artefactos en los experimentos de PEX, estructuras que no se formarían cuando se analiza el promotor fusionado al gen de la β -galactosidasa. Otra posible explicación de la diferencia observada entre los sitios de iniciación de la transcripción determinada en ausencia o presencia del gen *pac* de *E. coli*, podría tener su origen en la presencia de un fragmento contenido en el gen *pac* de *E. coli* que se ha propuesto que regula su expresión (Qiaoling y col. 1992a). Este fragmento

parece llevar dos potenciales fases abiertas de lectura que podrían codificar la(s) proteína(s) reguladoras de la transcripción.

Es importante resaltar aquí que se han encontrado algunos cambios en la secuencia de la región promotora del gen *pac* de *E. coli*, respecto de la secuencia previamente publicada por Valle y col. (1986). Estos cambios podrían deberse a simples errores de secuenciación, ahora bien, si estos cambios fueran reales, no podría descartarse la posibilidad de que estuvieran afectando a las propiedades del promotor. Por otra parte, ya se ha comentado que el sitio más probable de iniciación de la transcripción según el promotor sugerido por Oh y col. (1987) para el gen *pac* de *E. coli*, estaría localizado dos nucleótidos por delante del sitio de unión al ribosoma, lo que resulta ser una posición inusual para los genes de *E. coli*. Es evidente que los resultados presentados aquí no soportan en modo alguno esa propuesta.

Una vez localizado el sitio de iniciación de la transcripción se han analizado las posibles secuencias reguladoras que aparecen en los promotores de los genes *pac* de *K. citrophila*, y de *E. coli* (figuras 47, 48 y 49). Es sabido que en los promotores bacterianos, la función de la secuencia -35 constituye la señal de reconocimiento para la RNA polimerasa, mientras que la secuencia -10 permite que el complejo cerrado DNA-RNA adopte la conformación abierta, mediante el desenrollamiento del DNA (Schaller y col., 1975). En los promotores de los genes *pac* de *K. citrophila*, y de *E. coli* cuando se considera como sitio de iniciación de la transcripción la posición -77 (figura 47 y 49), la región -35 se conserva poco respecto de la secuencia consenso de los promotores σ^{70} de *E. coli*. Esta falta de similitud de la región -35 con la secuencia consenso, se ha encontrado en promotores que son absolutamente dependientes de la influencia de un efector positivo, por ejemplo *galP1*, *lPRE* y *araBAD*. Ya que la región -35 es importante en el reconocimiento de la polimerasa, los efectores serían en gran medida los responsables del reconocimiento en estos casos. En otros promotores regulados positivamente, como *lac* y *lRPM*, donde la región -35 está más conservada respecto de la secuencia consenso, se ha observado una interacción con la polimerasa, aunque de carácter débil en ausencia de sus efectores (Meyer y col., 1975; Majors, 1975).

Se sabe que la afinidad que presentan las secuencias promotoras por la RNA polimerasa es variable. Este aspecto es un factor importante en el control de la frecuencia de iniciación, y por tanto, de la magnitud de la expresión génica. La eficiencia de un promotor no puede predecirse con exactitud, basándose en su homología con la secuencia consenso de los promotores de *E. coli*. Virtualmente, todos los promotores varían respecto del consenso, por tanto los "vecinos" de cualquier base particular podrían diferir de promotor a promotor, incluso aunque dicha base se conserve. No puede predecirse el efecto del contexto, es posible que una base diferente de la consenso predicha en alguna posición pueda funcionar de forma eficiente en un promotor pero no en otro. Horwith y Loeb (1988) mostraron que en una población de secuencias al azar, había secuencias diferentes del consenso que actuaban como promotores más fuertes que

el consenso. Esto sugirió que estas secuencias podrían adoptar una conformación específica que las capacitase para funcionar como promotores. La idea de homología estructural entre diferentes promotores ha sido sugerida en diferentes ocasiones (Siebenlist y col., 1980; Grana y col., 1988; Lamond y Travers, 1983; Menzel y Gellert, 1983; Werel y col., 1991). La implicación de determinantes estructurales ha sido apoyada por estudios sobre el papel que desempeña la curvatura del DNA (Lamond y Travers, 1983; Gourse y col., 1986; Bracco y col., 1989; Lavigne y col., 1992) y del superenrollamiento en la iniciación de la transcripción de algunos genes (Menzel y Gellert, 1983). Los superenrollamientos negativos aumentan la fuerza de ciertos promotores, raramente se ha observado el efecto opuesto en otros promotores (Liu y col., 1988). Es posible que el reconocimiento de un promotor por la RNA polimerasa, esté modulado por la conformación local del DNA que viene dictada (predeterminada) por la secuencia, pudiendo esta conformación ser obtenida por varias secuencias. Un estudio comparativo de características estructurales comunes a las secuencias promotoras y sus secuencias flanqueantes ha mostrado que son menos estables, más flexibles y que tienen menor tendencia a adoptar conformación B que secuencias al azar (Lisser y Margalit, 1994). Por lo tanto, aunque puede afirmarse que la reacción típica de reconocimiento del promotor se basa en el reconocimiento de la RNA polimerasa de las secuencias consenso -35 y -10, no se puede descartar que existan otros mecanismos alternativos de reconocimiento. La función promotora parece el resultado de una combinación de varios factores más que la consecuencia única de una secuencia conservada en el genoma.

Durante mucho tiempo se creía que en *E. coli* sólo había un factor σ , denominado σ^{70} , pero se han descrito diferentes factores σ que participan en el cambio del patrón de proteínas expresadas bajo diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo el factor σ^{32} que interviene como resultado de un incremento en la temperatura (Grossman, y col., 1984). La transcripción del gen que codifica por este factor aumenta por efecto de otro factor de transcripción, el factor σ^{24} . Otro factor sigma, σ^N , es activado en condiciones de ausencia de nitrógeno. El factor σ^F , controla la transcripción de genes implicados en quimiotaxis y estructuras flagelares. En *B. subtilis* también se ha descrito un factor sigma principal, equivalente al σ^{70} de *E. coli*, pero también contiene una variedad de factores sigma menos abundantes. Algunos de estos factores se activan al iniciar la esporulación. La regulación de la esporulación implica una cascada de factores sigma, que activan sucesivamente diferentes clases de genes (Haldenwang y Losick, 1980). El fago SPO1 utiliza también este mecanismo regulador de la transcripción cuando infecta *B. subtilis*.

Uno de los puntos más sobresalientes en la última década de investigación sobre la expresión génica es el reconocimiento de que el DNA no sólo contiene la información de las proteínas estructurales y secuencias de reconocimiento para la unión de proteínas reguladoras, sino que también lleva intrínsecas propiedades estructurales que le hacen

desempeñar un papel activo en muchas funciones celulares (Pérez-Martín y col., 1994). En 1984 se asoció por primera vez la presencia de un determinado grado de curvatura en la secuencia precedente a un gen con la actividad promotora (Bossi y Smith, 1984). Posteriormente se ha demostrado una clara relación entre la fuerza de un promotor y la presencia de regiones curvadas en la secuencia precedente en el DNA (Plaskon y waltel, 1987). La curvatura del DNA es un elemento integral de la arquitectura del promotor, y parece ser uno de los principales factores de control de la expresión génica bacteriana. La curvatura podría cambiar la afinidad de una proteína reguladora en su sitio de reconocimiento o también actuar como elemento discriminador entre diferentes circuitos reguladores superimpuestos en un mismo promotor (Pérez-Martín y col., 1994).

Si el punto de iniciación de la transcripción del gen *pac* de *E. coli* se corresponde con la posición -30, se podría considerar que hay dos posibles sitios de unión de CRP, denominados CRP1 y CRP2 (figura 48). El sitio de unión del complejo CRP-cAMP respecto de CRP1 se sitúa a -113 pares de bases del inicio de la transcripción, en tanto que el sitio CRP2 se centra a -71 pares de bases. Teniendo en cuenta la distancia de CRP1 con respecto al promotor este sitio no permitiría que el complejo CRP-cAMP activara la transcripción por sí sólo, necesitando un segundo elemento regulador. Sin embargo, el centro de CRP2 más cercano, podría ser capaz de activar la transcripción sin ayuda de otras proteínas reguladoras. Estas afirmaciones se basan en el hecho de que la activación por CRP-cAMP es dependiente de la distancia del centro de sitio de unión del complejo al inicio del promotor. Cuando la unión del complejo se centra a -41, -61 o -71, el complejo CRP-cAMP por sí sólo es capaz de estimular la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa. Si se centra más lejos, necesita la participación de un segundo elemento regulador. (Raibaud y Schwartz, 1984). Un ejemplo de un sitio de unión de CRP centrado a -70 pares de bases es el promotor *malT*. Por otra parte, se ha identificado la presencia de dos sitios de unión en varios operones bacterianos, por ejemplo, en los promotores de *cat* y *ara* (De Crombrughe y col., 1984), *cea* (Shirabe y col., 1985), *nag* (Plumbidge y Kolb, 1991) y *cytR* (Gerlach y col., 1990). En estos casos el sitio de mayor afinidad se cree que es el que promueve la transcripción. El otro sitio de unión a CRP se une con menos afinidad y en muchos casos no es funcional. Por ejemplo, el gen *cea* que codifica para la colicina E1, es regulado positivamente por un sitio de CRP centrado en -63, mientras que un segundo sitio de CRP centrado en -107 no tiene efecto sobre la activación *in vivo*.

Si se considera como punto de iniciación de la transcripción el residuo -76 o -77, de los promotores de los genes *pac* de *K. citrophila* y de *E. coli*, respectivamente (figuras 47 y 49), sólo existiría un sitio de unión de CRP posible, que coincidiría con CRP1, ahora centrado aproximadamente a -60 pares de bases del inicio de la transcripción. Por tanto, sería capaz de activar la transcripción por sí mismo, como sucede con el promotor *lac* donde la unión del CRP se produce a la misma distancia. Si la unión se centra en -61, el mecanismo de activación es más simple que si centra a -41, y

se basa fundamentalmente en la unión CRP-RNA polimerasa. En el caso de que el CRP se una a una distancia de -41 pares de bases, hay dos efectos principales que contribuyen a la activación, el contacto directo CRP-RNA polimerasa y la estabilización de la curvatura del DNA en la zona anterior a la unión de la RNA polimerasa. Por último, cuando el centro de la unión de CRP se sitúa a -71 pares de bases, la activación es similar a cuando se sitúa a -61 (Kolb y col., 1993).

En aquellos promotores donde la unión del complejo se centra en -41, -61 o -71, la región -10 suele ser parecida a la secuencia consenso, mientras que en la mayoría de los casos la región -35 se muestra poco conservada (Raibaud y Schwartz, 1984). En estos casos la CRP y la RNA polimerasa se unen cooperativamente al promotor, y sus sitios de unión están correctamente yuxtapuestos. De esta manera el receptor CRP se une muy cerca de donde lo hace la RNA polimerasa y parece que para que la activación tenga lugar se necesita un contacto directo entre ellas, contacto que no siempre es suficiente para la activación por CRP (Kolb y col., 1993). Se ha postulado que la proteína CRP interacciona con la RNA polimerasa para promover la activación, y que estas interacciones vienen moduladas por la subunidad sigma de la polimerasa (Bostford y Harman, 1992). Ya se ha comentado anteriormente que la represión catabólica y la inducción por FA que tienen lugar en la expresión de los genes *pac*, podrían estar relacionadas a este nivel. Si la inducción por FA tuviera su origen, directa o indirectamente, en la utilización de un factor sigma de la RNA polimerasa, diferente al σ^{70} , la interacción con CRP también se vería afectada.

El plásmido pRS55E (figura 37) que porta una delección en la región -10 del promotor del gen *pac* de *E. coli*, que corresponde al sitio de iniciación de la transcripción en la posición -30 (figura 48), es capaz de experimentar represión catabólica por glucosa (figura 42). En este caso, los dos sitios posibles de unión de CRP, se han desplazado respecto de su situación en el promotor original del gen *pac* y resulta interesante observar que cuando se expresa el gen en condiciones de represión catabólica, se produce una inducción por FA (figura 42B). Este mismo fenómeno tenía lugar con los plásmidos portadores del promotor del gen *pac* de *K. citrophila* (figura 39B). Por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el fenómeno de inducción por FA no parece estar mediado simplemente por un mecanismo clásico de regulación positiva o negativa, sino que parece responder a un mecanismo complejo de regulación donde las condiciones ambientales y el estado metabólico, participan del proceso de regulación. La región reguladora del gen *pac* de *E. coli* podría utilizar alternativamente varios promotores, en función de sus requerimientos ambientales.

Se ha localizado en los promotores de los genes *pac* de *E. coli* y de *K. citrophila*, un elemento de reconocimiento de la RNA polimerasa, caracterizado por una secuencia rica en (A+T) (figuras 47, 48 y 49). A esta clase de elementos se les denomina UP ("upstream promoter") o "enhancer", y se localizan generalmente por delante de las regiones -10 y -35 del promotor (Deuschle y col., 1986; Plaskon y Wartell, 1987). Sin

embargo, no se ha definido una localización precisa de los mismos, no presentan una secuencia consenso, y su longitud puede oscilar de 10 a 20 pares de bases. Estos elementos estimulan la transcripción tanto *in vivo*, como *in vitro*, en ausencia cualquier factor proteico, con la obvia excepción de la RNA polimerasa. Se ha comprobado que es un módulo independiente dentro de la región promotora, que puede separarse de un promotor y fusionarse a otro, manteniendo su funcionalidad. La subunidad α de la RNA polimerasa parece estar implicada en el reconocimiento de este tipo de elementos (Ross y col., 1993). La activación de la transcripción asociada a zonas ricas en A se ha atribuido a efectos de la curvatura del DNA (Pérez-Martín y col., 1994). Por lo tanto, en algunos promotores, la curvatura del DNA podría requerirse para facilitar la interacción con la RNA polimerasa, aunque el grado de curvatura por sí sólo, no siempre fuera el responsable directo de la activación de la transcripción. En estos casos, la participación de secuencias específicas ricas en (A+T) darían cuenta de este fenómeno. La interacción entre el C-terminal de la subunidad α de la RNA polimerasa, y los elementos UP, podría jugar un papel en el mecanismo de actuación de otros activadores positivos, como por ejemplo, CRP-cAMP (Zou y col., 1992).

A lo largo de esta memoria ya se ha comentado varias veces que las fermentaciones para producir PGA en *E. coli* han de hacerse por debajo de 30 °C, ya que se produce una gran pérdida de actividad enzimática por encima de esta temperatura. Este efecto no puede atribuirse a la estabilidad de la enzima, ya que la PGA es muy estable a 50 °C, ni a la represión por catabolitos, pues sucede lo mismo con las cepas no reprimibles. Para tratar de encontrar una explicación a este fenómeno, se estudió si la influencia de la temperatura se producía a nivel transcripcional. Los resultados obtenidos al expresar las fusiones génicas a 30, 37 y 40 °C (figura 50), indican que la temperatura no parece afectar drásticamente al proceso de transcripción. Además resulta interesante observar que la inducción por FA tiene lugar a las tres temperaturas. El gen *pac* de *K. citrophila* también fue capaz de transcribirse a 30, 37 y 40 °C, no induciéndose por FA a ninguna de estas temperaturas (figura 51). Deretié y col. (1984) propusieron una correlación entre la estabilidad del plásmido portador del gen *pac* de *E. coli*, y el grado de activación transcripcional de dicho gen. Las condiciones empleadas en su estudio, correspondieron a una temperatura de crecimiento de 37 °C, temperatura a la que no se detecta actividad PGA de *E. coli*. Sin embargo, los estudios que se han mostrado en el apartado 3.6. de la sección resultados, demuestran como incluso a 37 °C se produce transcripción, y por tanto, los resultados obtenidos por estos autores deben tener otra explicación.

El procesamiento postraducciona del precursor es sensible a la temperatura según han demostrado Sizmann y col. (1990). Esto es debido posiblemente a que la temperatura por encima de 30 °C afecte a la(s) endopeptidasa(s) responsables del procesamiento del precursor en sus subunidades estructurales, o bien que afecte a la

actividad autoproteolítica propuesta para la PGA (Barbero y col. 1986). Alternativamente, el precursor podría estar adoptando una conformación impropia para su procesamiento.

BIBLIOGRAFIA

- Abbot, B.J. (1976) *Advances in Applied Microbiology* 20, 203-257.
- Abraham, E.P., y Chain, E.B. (1940) *Nature* 147, 837
- Abraham, E.P., Chain, E.B., Fletcher, C.M., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., y Jennings, M.A. (1941) *Lancet* 2, 177.
- Abrahmsen, L. y col. (1991) *Biochemistry* 30, 4151-4157.
- Aharonowitz, Y. y Cohen, G. (1992) *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 461-495.
- Alicino, J.F. (1961) *Anal. Chem.* 33, 648.
- Alonso, M.J., Bermejo, F., Reglero, A., Fernández-Cañón, J.M., González de Buitrago, G. y Luengo, J.M. (1988) *J. Antibiotics* 41, 1074-1084.
- Anderson, E., Mattiasson, B. y Hahn-Hagerdal, B. (1984) *Enzyme Microbial. Technol.* 6, 301.
- Andersson, E. y Hahn-Hägerdal, B. (1987a) *Biochim. Biophys. Acta* 912, 317-324.
- Andersson, E. y Hahn-Hägerdal, B. (1987b) *Biochim. Biophys. Acta* 912, 325-328.
- Applewhite, T.H., Martin, R.B. y Niemann, C. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1457.
- Aramori, I., Fukagawa, M., Tsumura, M., Iwami, M., Yokota, Y., Kojo, H., Kohsaka, M., Ueda, Y. e Imanaka, H. (1991a) *J. Fermentation Bioeng.* 72, 232-243.
- Aramori, I., Fukagawa, M., Tsumura, M., Iwami, M., Ono, H., Kojo, H., Kohsaka, M., Ueda, Y. y Imanaka, H. (1991b) *J. Bacteriol.* 173, 7848-7855.
- Aramori, I., Fukagawa, M., Tsumura, M., Iwami, M., Yokota, Y., Kojo, H., Kohsaka, M., Ueda, Y. e Imanaka, H. (1991c) *J. Fermentation Bioeng.* 72, 227-231.
- Asahi, K. K., (1978) *United States Patent* 4079180.
- Asahi, K.K. (1987) *Japanese Patent Public* 62-58716.
- Attwood, D. y Agarwall, S.P., (1984) *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 563-564.
- Baker, W. L. (1980) *J. Appl. Bacteriol.* 49, 225-229.
- Baker, W.L., (1983) *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 26-30.
- Baker, W.L. (1984) *Austral. J. Biol. Sci.* 37, 257-265.
- Baker, W. L. (1985) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31, 107-110.
- Baker, W.L. (1992) *J. Appl. Bacteriol.* 73, 14-22.
- Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P., Lilly, D. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 276, 250-256.
- Balbás, P. y Bolivar, F. (1990) *Meth. Enzymol.* 185, 14-37.
- Barbero, J.L., Buesa, J.M., González de Buitrago, G., Méndez, E., Pérez-Aranda, A. y García, J.L. (1986) *Gene* 49, 69-80.
- Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.H.C., y Rolinson, G.N. (1959) *Nature* 183, 257-262.
- Batchelor, F.R., Chain, E.B. y Rolinson, G.N. (1961a) *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 154, 487-490.

- Batchelor, F.R., Chain, E.B., Richards, M. y Rolinson, G.N. (1961b) *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* **154**, 522-526.
- Bauer, K., Kaufmann, W. y Ludwig, S.A. (1971) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 1723-1727.
- Baumann, F., Brunner, R. y Roehr, M. (1971) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 853-860.
- Bayer AG. (1975) *United States Patent* 3 910 825.
- Beecham Group Ltd. (1971) *Indian Patent* 132 666.
- Beecham Group Ltd (1974) *Federal Republic of Germany Patent* 2 335 079.
- Beecham Group Ltd. (1975a) *United States Patent* 3 887 432.
- Beecham Group Ltd (1975b) *United Kingdom Patent* 1 400 468.
- Beecham Group Ltd. (1976) *Indian Patent* 138 389.
- Behrens, O.K., Corse, J., Edwards, J.P., Garrison, L., Jones, R.G., Soper, Q.F., Vanabeele, F.R., y Whitehead, C.W. (1948) *J. Biol. Chem.* **175**, 793-798.
- Bender, M.L. y Kezdy, F.J. (1965) *Annu. Rev. Biochem.* **34**, 49-76.
- Bender, M.L., Kézdy, F.J. y Wedler, F.C. (1967) *J. Chem. Education* **44**, 84-88.
- Berezin, I.V., Klesov, A.A., Svedas, V.K., Nys, P.S. y Savitskya, E.M. (1974) *Antibiotiki* **19**, 880-887.
- Berezin, I.V., Klibanov, A.M., Klyosov, A.A., Martinek, K. y Svedas, V.K. (1975) *FEBS Lett.* **49**, 325-328.
- Binder, R., Brown, J., y Romancik, G. (1994), *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1805-1809.
- Blobel, G. y Dobberstein, D. (1975) *J. Cell. Biol.* **67**, 835.
- Blow, D.M. (1971) En *The Enzymes* (Boyer, P.D., Ed.) **3**, 213-248, Academic Press, Boca Ratón, FL.
- Blow, D.M. (1976) *Acc. Chem. Res.* **9**, 145-152.
- Blow, D. (1990) *Nature* **343**, 694-695.
- Böck, A., Wirth, G., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G. y Buckel, P. (1983a) *FEMS Lett.*, **20**, 135-139.
- Böck, A., Wirth, G., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G. y Buckel, P. (1983b) *FEMS Lett.*, **20**, 141-144.
- Boehringer Mannheim GmbH. (1985) Brochure n° 520.608.
- Bone, R. Silen, J.L. y Agard, D.A. (1989) *Nature* **339**, 191-193.
- Bondareva, N.S., Levitov, M.M. y Goryachenkova, E.V. (1969) *Biokhimiya* **34**, 96-101.
- Borisov, I.L., Markaryan, A.N., Penzikova, G.A., Oreshina, M.G., Galaev, I.Y., Bartoshevich, Y.E. y Svedas, V.K. (1984) *Biokhimiya* **49**, 519-526.
- Bossi, L. y Smith, D.M. (1984) *Cell* **39**, 643-652.

- Bostford, J.L. y Harman, J.G. (1992) *Microbiological Review* **56**, 100-122.
- Bouvrette, P. y Ziomek, E. (1992) *Anal. Biochem.* **200**, 315-320.
- Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S. y Buc, H. (1989) *EMBO J.* **8**, 4289-4296.
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L. y Menge, U. (1990) *Nature* **343**, 767-770.
- Brandl, E. (1965) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **342**, 86.
- Brosius, J y Lupski, J.R. (1987) *Meth. Enzymol.* **153**, 54-68.
- Brüning, H., Bruns, W., Collins, J., Hahn, W., Hoppe, J. y Mayer, H. (1984) *European Patent* 107823 A2. *Chemical Abstracts* **101**, 105166r.
- Bruns, W., Hoppe, J., Tsai, H., Brning, H.J., Maywald, F., Collins, J. y Mayer, H. (1985) *J. Mol. Appl. Genet.* **3**, 36-44.
- Bunnell, C.A., Luke, W.D. y Perry, F.M. (1986). En *B-lactam Antibiotics for Clinical Use*. (Queener, S.F., Webber, J.A. and Queener, S.W. Eds). pp. 255-284. Marcel Dekker, New York.
- Burlingame, R. y Chapman, P.J. (1983) *J. Bacteriol.* **155**, 113-121.
- Burtscher, H. y Schumacher, G. (1992) *Eur. J. Biochem.* **205**, 77-83.
- Bush, K. (1980) *Clin. Microb. Rev.* **1**, 109-123.
- Casadaban, M.J., Martinez-Arias, A., Shapira, S.K. y Chou, J. (1987) *Meth. Enzymol.* **100**, 293-308.
- Castro, J.M., Liras, P., Cortés, J. y Martín, J.F. (1986) *FEMS Microbiol. Lett.* **34**, 349-353.
- Chaiken, I. M., Komoriya, A., Ohmo, M. y Widmer, W. (1982) *Appl. Biochem. Bioeng.* **7**, 385-400.
- Chain, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J., y Saunders, A.G. (1940) *Lancet* **2**, 226-228.
- Chance, B. (1940) *J. Franklin Inst.* **229**, 455, 613, 637.
- Chandry, P.S., Davidson, B.E. y Hillier, A.J. (1994) *Microbiol.* **140**, 2251-2261.
- Chiang, D. y Bennet, R.E. (1967) *J. Bacteriol.* **93**, 302-308.
- Choi, K.S., Kim, J.A. y Kang, H.S. (1992) *J. Bacteriol* **174**, 6270-6276.
- Chou, P.Y. y Fasman, G.D. (1978) *Adv. Enzymol.* **47**, 45-148.
- Claridge, C.A., Gourevitch, A. y Lein, J. (1960) *Nature* **187**, 337-338.
- Claridge, C.A., Luttinger, J.R. y Lein, J. (1963) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **113**, 1008-1012.
- Clarke, P.H. (1978) En *Experiments in Microbial Evolution*. (Ornston, L.N. and Sokatch, J.R. Eds.) pp. 137-218. Academic Press, Inc. New York.

- Cole, M. y Rolinson, G.N. (1961) *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* **154**, 490-493.
- Cole, M. y Sutherland, R.S. (1966) *J. Gen. Microbiol.* **42**, 354-359.
- Cole, M. (1964) *Nature* **203**, 519-520.
- Cole, M. (1966) *Appl. Microbiol.* **14**, 98-102.
- Cole, M. (1967) *Process Biochem.* **2**, 35-40.
- Cole, M. (1969a) *Biochem. J.* **115**, 733-739.
- Cole, M. (1969b) *Biochem. J.* **115**, 741-745.
- Cole, M. (1969c) *Biochem. J.* **115**, 747-756.
- Cole, M. (1969d) *Biochem. J.* **115**, 757-764.
- Collins, J.F. y Richmond, M.H. (1962) *Nature* **195**, 142-144.
- Cooper, R.A. y Skinner, M.A. (1980) *J. Bacteriol.* **143**, 302-306.
- Cooper, R.A., Jones, D.C. y Parrot, S. (1985) *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2753-2757.
- Cornish-Bowden, A. (1974) *Biochem. J.* **137**, 143-144.
- Cox, E.C. y Yanofsky, C. (1969) *J. Bacteriol.* **100**, 390-397.
- Creighton, T.E. (1984) *Proteins*, Ed. Freeman, W.H. and company, New York.
- Cross, P.J. (1985) *European Patent Application* 138 338.
- Curti, B., Ronchi, S. y Pilone, S.M. (1992) En *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. Muller, F. Ed. CRC Press. Boca Raton.
- Dale, M.P., Kopfler, W.P., Chait, I. y Byers, L.D. (1986) *Biochemistry* **25**, 2522-2529.
- Daumy, G.O., McColl, A.S. y Apostolakis, D. (1982) *J. Bacteriol.* **152**, 104-110.
- Daumy, G. O., Danley, D., Mc Coll, A.S., Apostolakis, D., y Vinick, F.J. (1985a) *J. Bacteriol.* **163**, 925-932.
- Daumy, G.O., Danley, D., McColl, A.S., Apostolakis, D. y Vinick, F.J. (1985b) *J. Bacteriol.* **163**, 1279-1281.
- Daumy, G.O., Williams, J.A., McColl, A.S., Zuzel, T.J. y Danley, D. (1986) *J. Bacteriol.* **168**, 431-433.
- David, F., Bernard, A.M., Pierres, M y Marguet, D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17247-17252.
- De Crombrughe, B., Busby, S. y Buc, H. (1984) *Science* **224**, 831-838.
- Dehottay, P., Dusart, J., De Meester, F., Joris, B., Van Beeumen, J., Erpicum, T., Frere, J.M. y Ghuysen, J.M. (1987) *Eur. J. Biochem.* **166**, 345-350.
- Degnen, G.E. y Cox, E.C. (1974) *J. Bacteriol.* **117**, 477- 487.
- Delin, P.S., Ekstrom, B.A., Sjoberg, B., Thelin, K.H. y Nathorst-Westfelt, L.S. (1973) *United States Patent* 3 736 230.
- Dennen, D.W., Allen, C.C. y Carver, D.D. (1971) *Appl. Microbiol.* **21**, 907-910.
- Deretic, V., Francetic, O. y Glisin, V. (1984) *FEMS Lett.* **24**, 173-177.
- Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R y Bujard, H. (1986) *EMBO J.* **5**, 2987-2991.

- Dickerson, R.E. y Geis, I. (1983) *Hemoglobin*, Ed. Benjamin and Cummings, Menlo Park CA, USA.
- Douglass, J., Civelli, O. y Herbert, E. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 665-715.
- Duggleby, R.G. (1981) *Anal. Biochem.* **110**, 9-18.
- Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G. y Moody, P.C.E. (1995) *Nature* **373**, 264-258.
- Dulong de Rosnay, C., Castagnou, F. y Latrille, J. (1970) *Ann. Inst. Pasteur, Paris* **118**, 277-280.
- Ebright, R.H., Kolb, A., Buc, H., Kunkel, T.A., Krakow, J.S. y Beckwith, J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 6083-6087.
- Edwards, J.R. y Park, J.T. (1969) *J. Bacteriol.* **99**, 459-465.
- Eisenberg y col., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 140-144.
- Ellerby, L.M., Escobar, A.W., Fink, A.L., Mitchinson, C. y Wells, J.A. (1990) *Biochemistry* **29**, 5797-5806.
- Emini y col. (1985) *J. Virol.* **55**, 836-839.
- El-Din, S.M.B., y Attia, M.M. (1973) *Acta Microbiol. Pol. Ser. B*, **5**, 43-50.
- Erickson, R.C. y Bennett, R.E. (1965) *Appl. Microbiol.* **13**, 738-741.
- Erickson, R.C. y Dean, L.D. (1966) *Appl. Microbiol.* **14**, 1047-1053.
- Fasman, G.D. (1976) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Physical and Chemical Data*, 1, 3rd edn., CRC Press, Boca Ratón. FL.
- Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd edn. Freeman, W.H. y Co., NY.
- Fleming, A. (1932) *J. Pathol. Bacteriol.* **35**, 881-886.
- Fleming, I.D., Turner, M.K. y Napier, E.J. (1974) *Ger. Offen.* 24223.
- Florey, M.E., y Florey, H.W. (1943) *Lancet* **1**, 387-340.
- Forney, L.J., Wong, D.C.L. y Ferber, D.M. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2550-2555.
- Forney, L.J. y Wong, D.C.L. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2556-2560.
- Francetic, O., Marjanovic, N. y Glisin, V. (1988) *Chimicaoggi* **4**, 11-15.
- Francis, J.C. y Hansche, P.E. (1972) *Genetics* **70**, 59-73.
- Frère, J.-M. y Joris, B. (1985) *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **11**, 299-396.
- Fuganti, C. y Grasselli, P. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 3191-3194.
- Fuganti, C., Grasselli, P., Servi, S., Lazzarini, A. y Casati, P. (1988) *Tetrahedron* **44**, 2573-2578
- Fujii, T., Matsumoto, K. y Watanabe, T. (1976) *Process Biochem.* **11**, 21-24.
- Gang, D.M. y Shaik, K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **425**, 110-114.
- García, J.L. y Buesa, J.M. (1986) *J. Biotechnol.*, **3**, 187-195.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. y Robson, B. (1978) *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120.

- Gattenbeck, S., Nilsson, B., Olsson, A. y Uhlem, M. (1986) *International Patent Application*, 8 000 929.
- Gerlach, P., Valentin-Hansen, P. y Bremer, E. (1990) *Mol. Microbiol.* **4**, 479-488.
- Gerlt, J.A. y Gassman, P.G. (1993) *Biochemistry* **32**, 11943-11952.
- Ghadi, R y Sangodkar, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 983-993.
- Gibson, R.M., Christensen, H. y Waley, S.G. (1990) *Biochem. J.* **272**, 613-619.
- Glaxo (1975) *Japanese Patent Public* 50-7158.
- Goldberg, M.I. y Fruton, J.S. (1969) *Biochemistry* **8**, 86-97.
- Goldman-Engelman-Steiz (1986) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **15**, 321-353.
- Golub, E.I., Garayev, M.M., y Romanova, N.B. (1973) *Antibiotiki* **18**, 882-885.
- Golub, E.I. y Bel'kind, A.M. (1977) *Mikrobiologiya* **46**, 363-368.
- Gotovtseva, V.A., Yudina, O.D. y Levitov, M.M. (1965) *Mikrobiologiya* **34**, 180-185.
- Gourse, R.L., de Boer, H.A. y Nomura, M. (1986) *Cell* **44**, 197-205.
- Grana, D., Gardella, T. y Susskind, M.M. (1988) *Genetics* **120**, 319-327.
- Greenzaid, P. y Jenks, W.P. (1971) *Biochemistry* **10**, 1210-1222.
- Grossman, F., Erickson, S. y Gross, R. (1984) *Cell* **38**, 383-390.
- Guisan, J.M., Alvaro, G. y Blanco, R.M. (1986) *Biocatalysis in Organic Media (Symposium; Wageningen, The Netherlands)*, 56-57.
- Gunasekera, A., Ebright, Y.W y Ebright, R.H. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 6853-6856.
- Guo, L., Ye, Z., Yang, J. y Wang, M. (1989) *Shiyan Shenwu Xuebao* **22**, 99-110.
- Gutfreund, H. y Sturtevant, J.M. (1956a) *Biochem J.* **63**, 656-661..
- Gutfreund, H. y Sturtevant, J.M. (1956b) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **42**, 719.
- Haldenwang, L. y Losick, S. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 7000-7004.
- Hall, B.G. (1981) *Biochemistry.* **20**, 4042-4049.
- Hamilton-Miller, J.M.T. (1966) *Bacteriol. Rev.* **30**, 761-769/71.
- Hamsher, J.J. (1975) *United States Patent* 3 905 868.
- Hartley, B.S. y Kilby, B.A. (1954) *Biochem. J.* **56**, 288.
- Haupt, I. y Thrum, H. (1967) *Z. Allg. Mikrobiol.* **7**, 343-347.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L. y Rutter, W.J. (1992) *Science* **255**, 1249-1251.
- Hedstrom, L., Perona, J.J. y Rutter, W.J. (1994) *Biochemistry* **33**, 8757-8763.
- Henkin, T.M., Grundy, F.J., Nicholson, W.L., Chambliss, G.H. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**, 575-584.
- Herzberg, O. y Moulton, J. (1987) *Science* **236**, 694-701.
- Herzberg, O., Kapadia, G., Blanco, B., Smith, T.S. y Coulson, A. (1991) *Biochemistry* **30**, 9503-9509.
- Hirohara, H., Philipp, M. y Bender, M.L. (1977) *Biochemistry* **16**, 1573-1580.
- Holt, R. J. y Stewart, G. T. (1964a) *Nature* **201**, 824-826.

- Holt, R. J. y Stewart, G. T. (1964b) *J. Gen. Microbiol.* **36**, 203-208.
- Hoop-Woods (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 3824-3828.
- Horiuchi, T. Maki, H. y Sekiguchi, M. (1978) *Mol. Gen. Genet.* **163**, 277-283.
- Horwitz, M. S. Z. y Loeb, L. A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14724-14731.
- Huang, H.T., English, A.R., Seto, T.A., Shull, G.M. y Sobin, B.A. (1960) *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 3790-3794.
- Huang, H.T., Seto, T.A. y Shull, G.M. (1963) *Appl. Microbiol.* **11**, 1-6.
- Huber, R. y Bode, W. (1978) *Accounts Chem. Res.* **11**, 114-122.
- Hunt, P.D., Tolley, S.P., Ward, R.J., Hill, C.P. y Dodson, G.G. (1990) *Prot. Eng.* **3**, 635-639.
- Huper, F. (1973) *Federal Republic of Germany Patent* 2 157 970.
- Hyun, N. D.y Ryu, D. D. Y. (1988) *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 363-368.
- Ichikawa, Y., Murai, Y., Yamamoto, S., Shibuya, Y., Fujii, T., Komatsu, K. y Kodaira, R. (1981a) *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2225-2229.
- Ichikawa, Y., Shibuya, Y., Matsumoto, K., Fujii, T., Komatsu, K. y Kodaira, R. (1981b) *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2231-2235.
- Ikemura, H., Takagi, H. y Inouye, M. (1987) *J. Biol.Chem.* **262**, 7859-7864.
- Ito, K., Bassford, P.J. y Beckwith, J. (1981) *Cell* **24**, 707-717.
- Ishiye, M. y Niwa, M. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1132**, 233-239.
- Isogai, T., Fukagawa, M., Aramori, I., Iwami, M., Kojo, H., Ono, T., Ueda, Y., Kohsaka, M. e Imanaka, H. (1991) *Biotechnology* **9**, 188-191.
- Joris, B., Ghuysen, J.M., Dive, G., Renard, A., Dideberg, O., Charlier, P., Frere, J.M., Kelly, J.A., Boyington, J.C., Moews, P.C. y Knox, J.R. (1988) *Biochem. J.* **250**, 313-324.
- Kameda, Y., Kimura, Y., Toyoura, E.y Omori, T. (1961) *Nature* **191**, 1122-1124.
- Kang, J. H., Hwang, Y., y Yoo, O. J. (1991) *J. Biotechnol.* **17**, 99-108.
- Kasche, V. y Galunksy, B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 1215-1219.
- Kasche, V., Haufler, U. y Riechmann, L. (1984) *Ann. New York Acad. Sci.* **434**, 99-105.
- Kasche, V. (1985) *Biotech. Lett.* **7**, 877-880.
- Kasche, V. (1986) *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 4-16.
- Kasche, V., Haufler, U. y Riechmann, L. (1987) *Meth. Enzymol.* **136**, 280-292.
- Kato, K., Kawahara, K., Takahashi, T., y Kakinuma, A. (1980a) *Agr. Biol. Chem.* **44**, 1069-1074.
- Kato, K., Kawahara, K., Takahashi, T., y Kakinuma, A. (1980b) *Agr. Biol. Chem.* **44**, 1075-1081.
- Kaufman, W., Bauer, K., y Offe, H.A. (1960) *Antimicrobial Agents Annual* (Gray, P., Tabenkin, B. and Bradley, S.G. Eds). Plenum Press. New York,
- Kaufman, W. y Bauer, K. (1960) *Naturwissenschaften* **47**, 474-476.

- Kaufman, W. y Bauer, K. (1964) *J. Gen. Microbiol.* **35**:iv.
- Keck, W., Glaunee, B., Schwarz, U., Broome-Smith, J.K. y Spratt, B.G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1999-2003.
- Keilmann, C., Wanner, G. y Bock, A. (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 983-992.
- Kelly, J.A., Knox, J.R., Zhao, H., Frère, J.-M. y Ghysen, J.-M. (1989) *J. Mol. Biol.* **209**, 281-295.
- Keszdy, F. J. y Bender, M.L. (1962) *Biochemistry* **1**, 1097-1106.
- Kim, D.J. y Byun, S.M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 904-908.
- King, J. (1986) *Bio/Technology* **4**, 297-303.
- Klyosov, A.A., Svedas, V.K. y Galaev, I.Y. (1977) *Bioorg. Khim.* **3**, 800.
- Kolb, A., Spassky, A., Chapon, C., Blazy, B. y Buc, H. (1983) *Nucleic Acids Res.* **18**, 6853-6856.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. y Adhya, S. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 749-795.
- Konecny, J. (1981) *Biotechnol. Lett.* **3**, 112-117.
- Konecny, J., Sieber, M. y Scheneider, A. (1981) *Biotechnol. Lett.* **3**, 507-512.
- Konecny, J. (1983) *Enzyme Technology: Rotenburg Third Fermentation Symposium* (R.M. Lafferty, Ed.) pp. 309-314. Springer, Berlín.
- Konecny, J., Schneider, A. y Sieber, M. (1983) *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 451-467.
- Komori, T., Kunugita, K., Nakahara, K., Aogi, H. e Imanaka (1978) *Agric. Biol. Chem.* **42**, 1439-1446.
- Kossiakoff, A.A. y Spencer, S.A. *Biochemistry* **20**, 6462-6474.
- Kossiakoff, A.A. (1987) En *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F.A. y McPherson, A., Eds.) pp.369-412, John Wiley and Sons, New York.
- Kraut, J. (1977) *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 331-358.
- Kreamer, D., Pennewiss, H., Plainer, H. y Schnee, R. (1982) *European Patent Application* 58 767.
- Kutzbach, C. y Rauenbush, E. (1974) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 45-53.
- Kyte-Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685.
- Lagerlof, E., Nathorst-Westfield, L., Ekstrom, B. y Sjoberg, B. (1976) *Meth. Enzymol.* **44**, 759-766.
- Lamond, A. I. y Travers, A. A. (1983) *Nature* **305**, 248-250.
- Lavigne, M., Herbert, M., Kolb, A. y Buc, H. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 293-306.
- Lee, S.B. y Ryu, D.D.Y. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* **4**, 35-38.
- Lepidi, A.A., Nuti, M.P. y de Bertoli, M. (1970) *Ann. Microbiol.* **21**, 125-132.
- Levitov, M.M., Klapovskaya, K.I. y Kleyner, G.I. (1967) *Mikrobiologiya* **36**, 912-915.
- Lindsay, C.D. y Pain, R.H. (1990) *Eur. J. Biochem.* **192**, 133-141.

- Lindsay, C.D. y Pain, R.H. (1991) *Biochemistry* 30, 9034-9040.
- Lipman, D.J. y Pearson, W.R. (1985) *Science* 227, 1435-1441.
- Liu y col. (1988) *Cell* 53, 433-440.
- Lisser, S. y Margalit, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* 223, 823-830.
- Luethi, P. , Pessina, A. y Luisi, P.L. (1987) *Experientia* 43, 675-679.
- Lueng, D.W., Chen, E. y Goeddel, D.V. (1989) *Technique* 1, 11-15.
- Luengo, J.M., Iriso, J.L. y López-Nieto, M.J. (1986) *J. Antibiotics.* 39, 1754-1759.
- Magasanik, B. (1961) *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 26, 249.
- Mahajan, P.B. y Borkar, P.S. (1983) *Hind. Antibiot. Bull.* 25, 6-10.
- Mahajan, P.B. y Bokar, P.S. (1984) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 9, 421-437.
- Mahajan, P.B. (1984) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 9, 537-544.
- Maizels, N. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3585-3589.
- Majors, J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 4394-4398.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Marconi, W., Cecere, F., Morisi, F., Della Penna. G. y Rappuoli, B. (1973) *J. Antibiot.* 26, 228-231.
- Margolin, A.L., Svedas, V.K., Nys, P.S., Kol'tova, E.V., Savitskaya, E.M. y Berezin, I.V. (1978) *Antibiotiki* 23, 114-118.
- Margolin, A.L., Svedas, V.K. y Berezin, I.V. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* 616, 283-289.
- Margolin, A.L., Izumrudov, V.A., Svedas, V.K. y Zezin, A.B. (1982) *Biotech. Bioeng.* 24, 237-241.
- Márquez, G., Buesa, J.M., García, J.L. y Barbero, J.L. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 144-147.
- Martin, H.H. (1964) *J. Gen. Microbiol.* 36, 441-450.
- Martín, J., Prieto, I., Barbero, J.L., Pérez-Gil, J., Mancheño, J.M. y Arche, R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1037, 133-139.
- Martín, J., Slade, A., Aitken, A, Arche, R y Virden, R. (1991) *Biochem. J.* 280, 659-662.
- Martín, J., Prieto, I., Mancheño, J.M., Barbero, J.L. y Arche, R. (1993a) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 311-325.
- Martín, J., Mancheño, J.M. y Arche, R. (1993b) *Biochem. J.* 291, 907-914.
- Martín, L, Prieto, M. A., Cortés, E. y García, J. L. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 287-292.
- Matthew, B.W. (1968) *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- Matsuda, A. y Komatsu, K.I. (1985) *J. Bacteriol.* 163, 1222-1228.

- Matsuda, A., Matsuyamam, K., Yamamoto, K., Ichkawa, S. y Komatsu, K.I. (1987a) *J. Bacteriol.* **169**, 5815-5820.
- Matsuda, A., Toma, K. y Komatsu, K.I. (1987b) *J. Bacteriol.* **169**, 5821-5826.
- Mayer, H., Collins, J., y Wagner, F. (1979) En *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance* (Timmis, K.N. and Puhler, A. Eds) pp.459-470. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Mayer, H., Collins, J. y Wagner, F. (1980) *Enzyme Eng.* **5**, 61-69.
- Mayer, U., Buckel, P. y Brunner, H.(1988) Ger. Offen. D. 3621563./Boehringer Mannheim GMBH German Patent 3621563 Al. *Chemical Abstracts* 109, 69487a.
- McCullong, J.E. (1985a) *United Kingdom Patent Application* 2142336.
- McCullong, J.E. (1985b) *United States Patent Application* 509-501.
- McDugall, B., Dunnill, P. y Lilly, M.D. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* **4**, 114-118.
- Meevootison, V., Somsuk, P., Prachaktam, R., and Flegel, T. W. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1227-1229.
- Meevootisom, V. y Saunders, J.R. (1987) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 372-378.
- Menzel, R. y Gellet, M. (1983) *Cell* **34**, 105-113.
- Merino, E., Balbás, P., Recillas, F., Becerril, B., Valle, F. y Bolivar, F. (1992) *Molecular Microbiol.* **6**, 2175-2182.
- Messing, J. (1983) *Meth. Enzymol.* **101**, 20-78.
- Meyer, B.J., Kleid, D.G., Ptashne, M. (1975) *Proc. Natl. Acad.* **72**, 4785-4789.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Milstein, J.B. y Fife, T.H. (1969) *Biochemistry* **8**, 623-627.
- Moore, S. y Stein, W.H. (1948) *J. Biol. Chem.* **176**, 367-388.
- Moriyara, K. y Oka, T. (1977) *Biochem. J.* **163**, 531-542.
- Morita, H. e Iwata, T. (1984) *J. Ferment. Technol.* **62**, 217-220.
- Moyer, A.J., and Coghill, R.D. (1946) *J. Bacteriol.* **51**, 57-61.
- Moyer, A.J., and Coghill, R.D. (1947) *J. Bacteriol.* **53**, 329-335.
- Mullis, K.B. y Faloona, F.A. (1987) *Meth. Enzymol.* **155**, 335-350.
- Muneyuki, R., Mitsugi, T. y Kondo, E. (1981) *Chem. Ind.* **5**, 159-161.
- Nakare, T. (1986) *Crit. Rev.Microbiol.* **13**,1-62.
- Nam, D.H. y Ryu, D.D.Y. (1984) *J. Antibiot.* **37**, 1217-1220.
- Nam, D.H., Kim, C. y Ryu, D.D.Y. (1985) *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 953-960.
- Nara, T., Misawa, M., Okachi, R., y Yamamoto, M. (1971) *Agr. Biol. Chem.* **35**, 1676-1681.
- Nara, T., Okachi, R. y Kato, F. (1972) *Abstr. Int. Ferment. Symp.*, 4 th, p.207.
- Nyiri, L. (1967) *Nature* **214**, 1347-1349.

- Novak, L. y Weichet, J. (1965) *Experientia* 21, 360-363.
- Oh, S.J., Kim, Y.C., Park, Y.W., Min, W.Y., Kim, I.S. y Kang, H.S. (1987) *Gene* 56, 87-97.
- Ohashi, H., Katsuta, Y., Hashizume, T., Abe, S., Kajiura, H., Hattori, H., Kamei, T. y Yano, M. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2603-2627.
- Okachi, R., Misawa, M., y Nara, T. (1972a) *Agr. Biol. Chem.* 36, 925-930.
- Okachi, R., Misawa, M., Deguchi, T. y Nara, T. (1972b) *Agr. Biol. Chem.* 37, 1953-1957.
- Okachi, R., Kawamoto, I., Yamamoto, M., Takasawa, S., y Nara, T. (1973a) *Agr. Biol. Chem.* 37, 335-339.
- Okachi, R., Kato, F., Miyamura, Y. y Nara, T. (1973b) *Agr. Biol. Chem.* 37, 1953-1957.
- Okachi, R., y Nara, T. (1973c) *Agr. Biol. Chem.* 37, 2797-2804.
- Oliver, G., Valle, F., Rosetti, F., Gómez-Pedrozo, M., Santamaría, P., Gosset, G. y Bolívar, F. (1985) *Gene* 40, 9-14.
- Olsson, A., Hagstorn, T., Nilsson, B., Uhlen, M., y Gattenbeck, S. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1084-1089.
- Olsson, A. y Uhlen, M. (1986) *Gene* 45, 175-181.
- Oreshina, M.G., Penzikova, G.A., Levitov, M.M. y Bartoshevich, I.E. (1984) *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya* 20, 787-792.
- Otsuka Seiyaku Company (1972) *Japan Patent* 72 28 183.
- Ouellet, L. y Stewart, J.A. (1959) *Can. J. Chem.* 37, 737.
- Page, M.I., (1984) *Acc. Chem. Res.* 17, 144-151.
- Panbangred, W., Udombunditkul, M., y Meevootison, V., (1990) *Ann. New York Acad. Sci.* 613, 455-459.
- Park, J.T. y Johnson, M. (1949) *J. Biol. Chem.* 179, 585-591.
- Pérez-Martín, J., Rojo, F. y Lorenzo, V. (1994) *Microbiological Reviews* 58, 268-290.
- Perlman, D. y Halvorson, H.O. (1983) *J. Mol. Biol.* 167, 391-396.
- Perlman; R.L. y Pastan, I. (1968a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 656-660.
- Perlman; R.L. y Pastan, I. (1968b) *J. Biol. Chem.* 243, 5420-5425.
- Pessina, A., Luethi, P., Luisi, P.L., Prenosil, J. y Zhang, Y. (1988) *Helv. Chem. Acta.* 71, 631-634.
- Pfizer Inc (1975) *United States Patent* 3 957 580.
- Plaskie, A., Roets, E. y Vanderhaeghe, H. (1978) *J. Antibiot.* 31, 783-788.
- Plaskon, R.R. y Waltel, R.M. (1987) *Nucleic. Acids Res.* 15, 785-797.
- Plumbidge, J. y Kolb, A. (1991) *J. Mol. Biol.* 217, 661-679.
- Polgar, L. y Halasz, H (1982) *Biochem. J.* 207, 1-10.
- Power, S.D., Adams, R.M. y Wells, J.A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 3096-3100.

- Prabhune, A.A. y Sivaraman, H. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 317-322.
- Prieto, I., Martín, J., Arche, R., Fernández, P., Pérez Aranda, A. y Barbero, J.L. (1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 553-559.
- Prieto, I., Rodríguez, M.C., Márquez, G., Pérez-Aranda, A. y Barbero, J.L. (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 659-662.
- Prieto, A., Pérez-Aranda, A. y García, J.L. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 2162-2167.
- Prieto, A. y García, J.L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22823-22829.
- Pruess, D.L. y Johnson, M.J. (1965) *J. Bacteriol.* **90**, 380-384.
- Prusak, E., Wiczorek, J. y Szewczuk, A. (1987) *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **35**, 57-62.
- Qiaoling, J., Ruping, W y Shengli, Y. (1992a) *Chinese. J. Biotechnol.* **8**, 105-115.
- Qiaoling, J., Ruping, W y Shengli, Y. (1992b) *Chinese. J. Biotechnol.* **8**, 153-158.
- Quax, W. J., Misset, O., Van der Laan, J., Lenting, H. B. (1991) *Patent Cooperation Treaty (PTC) WO 91/16435*.
- Queener, S. y Swart, R. (1979) *Economic Microbiol.* **3**, 35.
- Queener, S.W. y Neuss, N. (1982) En *The Chemistry and Biology of Beta-Lactam Antibiotics* (Morin, E.B. and Morgan, M. Eds) **3**: 1-81. London.
- Queener, S.W. (1990) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 943-948.
- Raibaud, O. y Schwartz, M. (1984) *Annu. Rev. Genet.* **18**, 173-206.
- Ramírez, O. T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F., y Quintero, R. (1994) *Proc. Biochem.* **29**, 197-206.
- Rambosek, J., Davis, R. y Crawford, M. (1990) *Penicillin Symposium*. Berlin, Germany. September, 1990.
- Reyes, F., Martínez, M.-J. y Soliveri, J. (1989) *J. Pharma. Pharmacol.* **41**, 136-137.
- Robas, H., Zouheiry, G., Branlant, G. y Branlant, C. (1993) *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 14-24.
- Robak, M. y Szewczuk, A. (1981) *Acta Biochem. Pol.*, **28**, 275-284.
- Robertus, J.D., Kraut, J., Alden, R. y Birktoft, J. (1972) *J. Biochem.* **11**, 4293-4303.
- Roberts, D.V. (1977) En *Enzyme Kinetics* (Elmore, D.T., Leadbetter, A.J. y Schofield, K., Eds.), pp. 57-58, Cambridge University Press, London.
- Rodríguez, M.E., Quintero, R. y López-Munguía, A. (1994) *Process Biochem.* **29**, 213-218.
- Rolinson, G.N., Batchelor, F.R., Butterworth, D., Cameron-Wood, J., Cole, M., Eustace, C.G., Hart, M.V., Richards, M. y Chain, E.B. (1960) *Nature* **187**, 236-237.
- Romanova, N.B., Belkind, A.M., Dolgova, M.I. y Golub, E.I. (1976) *Antibiotic* **21**, 600-603.

- Ross, G. y O'Callaghan, C.H. (1975) *Meth. Enzymol.* **43**, 69-85.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K. y Gourse, R.L. (1993) *Science* **262**, 1407-1413.
- Rossi, D., Romeo, A., Lucente, G. y Tinti, O. (1973) *Farmaco, Ed. Sci.* **28**, 262-265.
- Roughton, F.J.W. (1934) *Proc. R. Soc.* **B115**, 475-482.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K. y Gourse, R.L. (1993) *Science* **262**, 1407-1413.
- Roy, A., Haziza, C. y Danchin, A. (1983) *EMBO J.* **2**, 791-797.
- Ryu, Y.W. y Ryu, D.D.Y. (1987) *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 339-344.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985) *Science* **230**, 1350-1354.
- Sakaguchi, K., and Murao, S. (1950a) *J. Agr. Chem. Soc. Jap.* **23**, 163-166.
- Sakaguchi, K., and Murao, S. (1950b) *J. Agr. Chem. Soc. Jap.* **23**, 411-414.
- Sambrook, J., Fritisch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, T., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463-5467.
- Savidge, T.A. (1984) *Biotechnology of Industrial Antibiotics* (Vandamme, E.J. Ed.).p. 171. New York: Marcel Dekker Co.
- Savidge, T. y Cole, M. (1975) *Methods Enzymol.* **43**, 705-721.
- Schaaper, R.M. (1989) *Genetics* **121**, 205-212.
- Schechter, I. y Berger, A. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.
- Scheper, T.H., Weiss, M. y Schügerl, K. (1986) *Anal. Chim. Acta* **182**, 203-206.
- Schmid, G. y Böck, A. (1981) *J. Bacteriol.* **147**, 282-288.
- Schneider, W. J. y Rocher M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* **452**, 177-185.
- Schömer, U., Segner, A. y Wagner, F. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 307-312.
- Schumacher, G., Sizmann, D., Haug, H., Buckel, P., y Böck, A. (1986) *Nucl. Acid. Res.* **14**, 5713-5727.
- Segel, I.H. (1975) *Enzyme Kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems*. Wiley, J. and Sons, Inc.
- Shaibe, E., Metzger, E. y Halpern, Y.S. (1985) *J. Bacteriol.* **163**, 938-942.
- Shaikh, K., Talati, P. G., y Gang, D. M. (1973) *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**, 194-197.
- Shaller, H., Gray, C., Herrmann, K. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 737-741.
- Shaw, W.V. (1975) *Meth. Enzymol.* **43**, 737-743.
- Sheenan, I.J., y Henery-Logan, K.R., (1959) *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 5838-5841.
- Shewale, J. G., y Sivaraman, H., (1989) *Proc. Biochem.* **24**, 146-154.

- Shewale, J.G., Desphande, B.S., Sudhakaran, V.K. y Ambeekar, S.S. (1990) *Process Biochem. Intern.* **25**, 97-103.
- Shibuya, Y., Matsumoto, K. y Fujii, T. (1981) *Agr. Biol. Chem.* **45**, 1561-1567.
- Shimi, I.R. e Imam, G.M. (1966) *Biochem J.* **101**, 831-836.
- Shimizu, M., Okachi, R., Kimura, K. y Nara, T. (1975) *Agr. Biol. Chem.* **39**, 1655-1661.
- Shirabe, K., Ebina, Y., Miki, T., Nakazaiva, T. y Nakazaiva, A. (1985) *Nucleic. Acids Res.* **13**, 4687-4698.
- Shotton, D.M. y Watson, H.C. (1969) *Nature* **25**, 811-816.
- Shvyadas, V.Y., Margolin, A.L., Sherstyuk, S.F., Klesov, A.A. y Berezin, I.V. (1977) *Bioorg. Khim.* **3**, 546-554.
- Siebenlist, U., Simpson, R.B. y Gilbert, W. (1980) *Cell* **20**, 269-281.
- Siewinsky, M., Kuropatwa, M. y Szewczuk, A. (1984) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **635**, 829-837.
- Singh, K., Seghal, S.N. y Vezina, D. (1969) *Appl. Microbiol.* **17**, 643.
- SivaRaman, C., Bheemeshwar, B., Ramachandran, S., y Borkar, P.S (1976b) *Indian Patent* 139 908.
- SivaRaman, C. Subramanian, S.S., SivaRaman, H., Rao, B.S.Ratnaparkhi, R.R., Ramachandran, S., Borkar, P.S. y Thadani, S.B. (1976a) *Indian Patent* 139 907.
- Sizmann, D., Keilmann, C. y Böck, A. (1990) *Eur. J. Biochem.* **192**, 143-151.
- Sjöberg, G., Nathorst-Westfelt, L. y Ortengren, B. (1967) *Acta Chem. Scand.* **21**, 547.
- Slade, A., Horrocks, A.J., Lindsay, L.C., Dunbar, B. y Virden, R. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 75-80.
- Slezak, J., Vojtisek, V., Sikyta, B., Brecka, A., y Benda, A. (1987) *Czech Patent* 246957 (Cl. C12N9/86) *Chemical Abstracts* 110,152784m.
- SNAM Proghetti. (1976) *United States Patent* 3 947 325.
- SNAM Proghetti (1981) *Federal Republic Germany Patent* 2 950 985.
- Spencer, B. y Maung, G. (1970) *Biochem. J.* **118**, 29.
- Squibb, E.R. y Sons Inc. (1969) *United States Patent* 3 446 705.
- Steitz, T.A., Henderson, R. y Blow, D.M. (1969) *J. Mol. Biol.* **46**, 337-348.
- Stoppok, E., Schomer, U., Segner, A., Mayer, H. y Wagner, F. (1981) *Adv. Biotechnol.* **3**, 547-551.
- Strynadka, N.C.J., Adachi, H., Jensen, S.E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K. y James, M.N.G. (1992) *Nature* **359**, 700-705.
- Sudhakaran, V.K. y Borkar, P.S. (1985) *Hind. Antibiot. Bull.* **27**, 44-49.
- Sudhakaran, V.K., Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S. y Shewale, J.G. (1992) *Process Biochem.* **27**, 131-143.

- Svedas, V.K., Margolín, A.L. y Berezín, I.V. (1980) *Enzyme Microb. Technol* **2**, 138-144.
- Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971) *Anal. Biochem.* **39**, 462-477.
- Sweet, R.M. (1972) *Cephalosporins and Penicillins, Chemistry and Biology*. (Flynn, E.H., Ed.) Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana. Academic Press, New York and London.
- Szentirmai, A. (1964) *Appl. Microbiol.* **12**, 185-187.
- Szewczuk, A., Siewinski, M. y Slowinska, R. (1980) *Anal. Biochem.* **103**, 166-169.
- Takasawa, S., Okachi, R., Kawamoto, I., Yamamoto, M. y Nara, T. (1972) *Agr. Biol. Chem.* **36**, 1701-1707.
- Tewari, Y.B. y Goldberg, R.N. (1988) *Biophys. Chem.* **29**, 245-252.
- Thadhani, S.B., Borkar, P.S. y Ramachandran, S. (1972) *Biochem. J.* **128**, 49-54.
- Thöny-Meyer, L., Stax, D. y Hennecke, H. (1989) *Cell* **57**, 683-697.
- Tipper, D.J. y Strominger, J.L. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **54**, 1133-1140.
- Tonomura, B., Nakatani, H., Ohnishi, M., Yamaguchi-Ito, J. y Hiromi, K. (1978) *Anal. Biochem.* **84**, 370-383.
- Toyo Jozo (1976) *Japanese Patent Open* 51-44695.
- Tsukada, H. y Blow, D.M. (1985) *J. Mol. Biol.* **184**, 703-711.
- Ulmann, A., Tillier, F. y Monod, J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 3476-3479.
- Ulmann, A. (1985) *Biochimie* **67**, 29-34.
- Uozumi, N. (1989) *J. Bacteriol* **171**, 375-382.
- Uri, J., Valu, G. y Bekesi, I. (1963) *Nature* **200**, 896-898.
- Valle, F., Gosset, G., Tenorio, B., Oliver, G. y Bolívar, F. (1986) *Gene* **50**, 119-123.
- Valle, F., Balbás, P., Merino, E. y Bolívar, F. (1991) *Trends Biochem. Sci.* **16**, 36-40.
- Vandamme, E.J., Voets, J.P. y Beyaert, G. (1971) *Meded. Rijksfac. Landbouwwetensch., Gent* **36**, 577.
- Vandamme, E. J. (1973) *Fed. Eur. Biochem. Soc. Symp. Abstracts*, p. 53.
- Vandamme, E.J. y Voets, J.P. (1973) *Z. Allg. Mikrobiol.* **13**, 701.
- Vandamme, E.J., y Voets, J.P., (1974) *Adv. Appl. Microbiol.* **17**, 311-369.
- Vandamme, E.J. y Voets, J.P. (1975) *Experientia* **31**, 140-143.
- Vandamme, E.J. (1980) *Economic Microbiol.* **5**, 467-469.
- Vandamme, E.J. (1981a) *Chem. Technol. Biotechnol.* **31**, 367-369.
- Vandamme, E.J. (1981b) *En Economic Microbiology* **5** (Rose, A.H., Ed.) pp.467-522, Academic Press.
- Vandamme, E.J.(1983) *Enzyme Microb. Technol.* **5**, 403-416.
- Vandamme,E.J. (1988) *Immobilised Enzymes and Cells: Fundamentals and Applications* (Moo-Young, M., Ed) pp. 261-286, New York: Marcel Dekker.

- Vanderhaeghe, H., Claesen, M., Vlietinck, A. y Parmentier, G. (1968) *Appl. Microbiol.* **16**, 1557-1560.
- Vanderhaeghe, H. (1975) *Meth. Enzymol.* **43**, 721-728.
- Van Heyniger, E. y Ahern, L.K. (1968) *J. Med. Chem.* **11**, 933-939.
- Vasilescu, I., Vociu, M., Voinescu, R., Birladeanu, R., Sasarman, E. y Rafirotu, I. (1969) *EnAntibiotics* (M. Herold y Z. Gabriel, Eds.) pp. 518. Butterworth, London.
- Veronese, F., Franchi, D., Boccú, E., Guerrato, A. y Orsolini, P. (1981) *Il farmaco-Ed. Sc.* **36**, 663-670.
- Vlasuk, G.P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6195-6202.
- Voets, J.P. y Vandamme, E.J. (1972) *Abstr. Int. Ferment. Symp.* **4 th**, p.246.
- Vojtisek, V. y Slezak, J. (1975a) *Folia Microbiol.* **20**, 289-297.
- Vojtisek, V. y Slezak, J. (1975b) *Folia Microbiol.* **20**, 298-306.
- Vojtisek, V. y Slezak, J. (1975c) *Folia Microbiol.* **20**, 224-230.
- Vojtisek, V. Hunkova, Z., Krumphanzi, V., Jakubona, A., Bucko, M., Miklas, E., Barta, M. and Culik, K. (1987) *Czech Patent 240247 B1. Chemical Abstracts* **110**, 132112n.
- Waldmann, H. (1988a) *Liebigs Ann. Chem.* **1175**-1180.
- Waldmann, H. (1988b) *Tetrahedron Lett.* **29**, 1131-1134.
- Waldmann, H. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 3057-3058.
- Walschmidt-Leitz, E. y Bretzel, G. (1964) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **377**, 222-225.
- Walton, R., (1964) *Dev. Ind. Microbiol.* **5**, 349-353.
- Wang, Q.C., Fei, J., Cui, D.F., Zhu, S.G. y Xu, L.G. (1986) *Biopolymers* **25**, S109-S114.
- Wanner, B.L., Kodaira, R. y Neidhardt, F.C. (1978) *J. Bacteriol.* **136**, 947-954.
- Warren, G. (1987) *Nature* **327**, 17.
- Warshel, A. (1989) *Biochemistry* **38**, 3629-3637.
- Wells, J.A. (1988) *Nature* **332**, 564-568.
- Werel, W., Schickor, P. y Heumann, H. (1991) *EMBO J.* **10**, 2589-2594.
- Wetlaufer, D.B. (1962) *Adv. Protein Chem.* **17**, 303-390.
- Wickner, V. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 23-34.
- Williams, J.A. y Zuzel, T.J. (1985) *J. Cell Biochem. (Suppl.)* **9B**, 99-102.
- Wills, C. y Phelps, J. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 627-637.
- Winkler, F.K., D'Arcy, A. y Hunziker, W. (1990) *Nature* **343**, 771-774.
- Wise, E.M. y Park, J.T. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 75-79.
- Wu, Z., Yang, X., Ren, X. y Wu, J. (1988) *Kangshengsu* **13**, 44-49.

- Yang, S., Wu, R., Wang, J., He, J. y Zhang, J. (1988) *Shengwu Gongcheng Xuebao* 4, 32-37.
- Zhang, Q., Zhang, L., Han, H., y Zhang, Y. (1986) *Anal. Biochem.* 156, 413-416.
- Zhang, H., Scholl, R., Browse, J. y Somerville, C. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 1220.
- Zhang, Q. y Zhang, L. (1990) *Biotechnol. Lett.* 12, 493-498.
- Zhang, Q., Xu, W. y Shi, L. (1991) *Anal. Biochem.* 196, 201-206.
- Zhou, G.W., Guo, J., Huang, W., Fletterick, R.J. y Scanlan, T.S. (1994) *Science* 265, 1059-1064.
- Zhu, X., Ohta, Y., Jordan, F. y Inouye, M. (1989) *Nature* 339, 483-484.
- Zou, C., Fujita, N., Igarashi, K. e Ishihama, A. (1992) *Mol. Microbiol.* 6, 2599-2602.